

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE NUEVOS COMPLEJOS DE RUTENIO (II)

Marta García-Avello Méndez

Trabajo Fin de Máster
Química y Desarrollo Sostenible
2013/2014

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

Universidad de Oviedo

Trabajo Fin de Máster

Curso 2013-2014

D^a. **Marta García-Avello Méndez**, Licenciada en Química, ha realizado la Memoria titulada “**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE NUEVOS COMPLEJOS DE RUTENIO (II)**” bajo la dirección de la Profesora Dña. M^a Elena Lastra Bengochea, de Química Inorgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

La directora certifica que la citada Memoria se ha realizado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección y autoriza su presentación para que sea calificada como **Trabajo Fin de Máster** del *Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible* correspondiente al Curso 2013-2014.

Oviedo, a 10 de Julio de 2014

Fdo. Marta García-Avello Méndez

Fdo. M^a Elena Lastra Bengochea

ÍNDICE

ÍNDICE

1. Introducción y antecedentes	9
1.1. Objetivos	19
2. Discusión de resultados	21
2.1. SÍNTESIS DE COMPLEJOS HIDRUROTRIS(PIRAZOLIL)BORATO DE RUTENIO (II)	22
2.1.1. Síntesis y caracterización del complejo [RuCl{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(en)] (1)	22
2.1.2. Síntesis y caracterización de complejos [RuCl{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(N-N)] [N-N = phen (2), 2,2'-bipy (3)]	23
2.1.3. Síntesis y caracterización de los complejos [Ru{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(N-N)(PTA)][PF ₆] [N-N = phen (4), 2,2'-bipy (5)]	26
2.1.4. Síntesis y caracterización de complejo [Ru{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(PPh ₃)(PTA)(L)][PF ₆] [L = py (6), quin. (7)]	28
2.1.5. Síntesis y caracterización de complejos [Ru{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(PPh ₃)(1-Me-PTA)(L)][PF ₆] ₂ [L = py (8), quin. (9)]	31
2.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	34
2.2.1. Interacción con el ADN, estudio del retardo de la movilidad en gel de un plásmido	34
2.2.2. Estudio de la actividad antitumoral- Citometría de flujo	37
2.3. CONCLUSIONES	43

3. Parte experimental	45
3.1 CONDICIONES GENERALES DE REACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE PARTIDA	45
3.2 TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS	45
3.3 ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	48
3.4 SÍNTESIS DE COMPLEJOS HIDRUROTRIS(PIRAZOLIL)BORATO DE RUTENIO (II) CON LIGANDOS N-DADORES.	49
3.4.1. Síntesis y caracterización del complejo [RuCl{κ ³ (N,N,N)-Tp}(en)] (1)	49
3.4.2. Síntesis y caracterización de complejos [RuCl{κ ³ (N,N,N)-Tp}(N-N)] [N-N = phen (2), 2,2'-bipy (3)]	50
3.4.3 Síntesis y caracterización de complejos [Ru{κ ³ (N,N,N)-Tp}(N-N)(PTA)] [PF ₆] [N-N = phen (4), 2,2'-bipy (5)]	52
3.4.4 Síntesis y caracterización de complejo [Ru{κ ³ (N,N,N)-Tp}(PPh ₃)(PTA)(L)][PF ₆] [L = py (6), quin. (7)]	54
3.4.5. Síntesis y caracterización de los complejos [Ru{κ ³ (N,N,N)-Tp}(PPh ₃)(1-Me-PTA)(L)][PF ₆] ₂ [L = py (8), quin. (9)]	57
4. Bibliografía	61

Abreviaturas

En todo el texto:

Ph	Fenilo, C ₆ H ₅
MeCN	Acetonitrilo, C ₂ H ₃ N
COD	Ciclooctadieno, C ₈ H ₁₂
THF	Tetrahidrofurano, C ₄ H ₈ O
MeOH	Metanol, CH ₄ O
Cp	η ⁵ -ciclopentadienilo, C ₅ H ₅
Me	Metilo, CH ₃
TMS	Tetrametilsilano, C ₄ H ₁₂ Si
t. a.	Temperatura ambiente
ref.	Temperatura de reflujo
Hz	Hertzio (s ⁻¹)
Tp	Hidrurotris(pirazolil)borato
phen	Fenantrolina
DMF	Dimetilformamida C ₃ H ₇ NO
2,2'-bipy	2,2'-bipiridina
en	Etilendiamina, NH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
tmeda	Tetrametiletildiamina, (CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂
py	Piridina
quin.	Quinolina
PTA	1, 3, 5-triaza-7-fosfatriciclo [3.3.1.1] decano
DMSO	Dimetilsulfóxido, CH ₃ SOCH ₃
TPPMS	3-difenilfosfinobencenosulfonato de sodio

En los espectros IR:

d	débil
m	media
mf	muy fuerte

En los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN):

sa	Singulete ancho
s	singulete
d	doblete
dd	doblete de dobletes
t	triplete
da	doblete aparente
ta	triplete aparente
sept	septuplete
m	multiplete
ppm	partes por millón
J	constante de acoplamiento
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Coherence”
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
NOE	“Nuclear Overhauser Effect”
COSY	“Correlation Spectroscopy”

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1 Introducción y antecedentes

En los últimos años, el diseño de nuevos complejos metálicos con aplicaciones terapéuticas se ha convertido en un área en pleno desarrollo dentro de la Química de Coordinación, debido a la actividad como agentes antivirales y antitumorales¹ que presentan algunos de ellos.

Actualmente el número de compuestos metálicos de uso clínico en tratamientos contra el cáncer es muy limitado y solo tres compuestos de Pt (II) son utilizados como fármacos anticancerígenos: [*cis*-diaminodichloroplatino (II)] (cisplatino), [Figura 1.1.a] [*cis*-diaminociclobutandicarboxilatoplatino (II)] (carboplatino) [Figura 1.1.b] y [(*1R,2R*-diaminociclohexano)oxalatoplatino (II)] (oxalilplatino) [Figura 1.1.c].

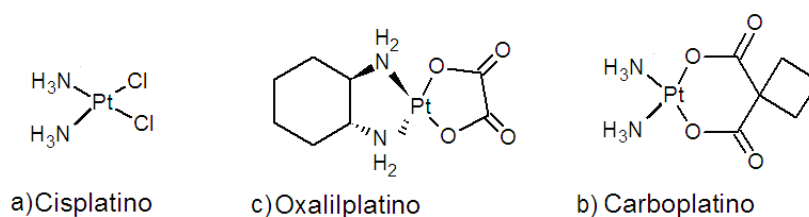


Figura 1.1: Estructuras de drogas antitumorales de Pt, utilizadas actualmente.

La actividad biológica del cisplatino fue descubierta en 1960 por Rosenberg, quien observó la capacidad de este derivado para inhibir la división celular de la bacteria *Escherichia Coli*. Desde entonces, el cisplatino ha sido objeto de diferentes estudios y se ha convertido en el primer complejo de transición utilizado clínicamente como medicamento antitumoral. En la actualidad se utiliza en el tratamiento, entre otros, de tumores de testículo y de ovario, linfomas, osteosarcomas y melanomas^{2,3}.

Sin embargo, el uso de estas drogas de Pt conlleva algunos problemas. Por un lado, presentan elevada toxicidad, lo que provoca importantes efectos secundarios no deseados⁴. Por otro lado, algunos tumores primarios son resistentes a estos

medicamentos, o adquieren resistencia a ellos tras el tratamiento inicial⁵ y son inactivos frente a procesos de metástasis. Otro inconveniente es su baja solubilidad en agua, que obliga a que su administración sea sólo posible por vía intravenosa⁶.

Todas estas limitaciones provocan que el estudio de complejos de metales de transición diferentes al Pt con propiedades anticancerígenas⁷ se haya convertido en un área de gran actividad en la investigación química. En este sentido, el rutenio es uno de los metales más prometedores en esta área. Así, el rutenio posee algunas ventajas sobre otros metales a la hora de sintetizar compuestos con aplicaciones clínicas. Los complejos de rutenio han sido utilizados anteriormente como inmunosupresores⁸, agentes antimicrobianos⁹ y fármacos contra la malaria¹⁰. Por una parte, bajo condiciones fisiológicas puede presentar distintos estados de oxidación, (Ru(II), Ru(III) y Ru(IV)), lo cual puede ser relevante ya que la actividad anticancerígena de muchos complejos depende del estado de oxidación del metal. Además, su amplia química de coordinación facilita la variedad estructural, tanto en los índices de coordinación como en la geometría de los compuestos.

Otra de las características que hace especialmente interesantes a los complejos de rutenio es su capacidad para mimetizar el hierro. El rutenio se sirve de los mecanismos de eliminación y transporte desarrollados en el organismo para el hierro, minimizando así su toxicidad. Por otro lado, el rutenio puede coordinarse a moléculas biológicas como la albúmina o la transferrina, lo que le permite actuar selectivamente sobre las células cancerígenas, que presentan sobre-expresados los receptores de transferrina¹¹.

En la actualidad un gran número de compuestos de rutenio ha mostrado actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, y algunos están en siendo objeto de ensayos clínicos.

En 1976 se describió el primer complejo de Ru(III) con propiedades antitumorales, $[fac\text{-Ru}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}_3]^{12}$. Desde entonces muchos complejos de Ru(III) han sido ensayados como agentes tumorales y dos de ellos, el complejo $[trans\text{-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})][\text{ImH}]$ (Im = imidazol) (NAMI-A) y el complejo $[trans\text{-RuCl}_4(\text{Ind})_2][\text{IndH}]$ (In = indazol) (KP1019), han superado la fase I de los ensayos clínicos^{13,14} [Figura 1.2]. El NAMI-A inhibe la formación de metástasis en el pulmón¹⁵, aunque no es activo frente a los tumores primarios, por lo que sería complementario al cisplatino. El KP1019 induce procesos de apoptosis en células de cáncer colorrectal¹⁶.

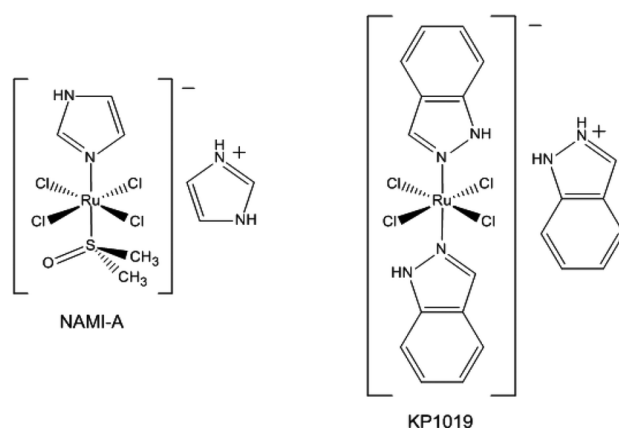


Figura 1.2: Estructuras de complejos de Ru(III) que han superado la fase 1 de los ensayos clínicos.

Los estudios realizados con estos compuestos ha sugerido que los compuestos de Ru(III) son activados por reducción *in vivo* a Ru(II), el cual se coordina con mayor rapidez a biomoléculas¹⁷ debido a la mayor labilidad del enlace Ru(II)-Cl¹⁸. En las células tumorales la concentración de oxígeno es menor y el pH es más ácido que en los tejidos normales, y la reducción de Ru(III)/Ru(II) está favorecida¹⁷. Esto condujo a investigar la actividad anticancerígena de los complejos de Ru(II), que ha sido estudiada en numerosos compuestos⁷ durante los últimos 30 años.

Entre los compuestos de Ru(II) que presentan mayor actividad anticancerígena se encuentran complejos con ligandos polipiridina, poliaminocarboxilato, dimetilsulfóxido,

arilazopiridina y areno. De todos ellos, los complejos semisandwich areno Ru(II) son especialmente activos y versátiles.

Uno de los primeros complejos de Ru(II) que fue estudiado biológicamente fue el complejo con ligando areno $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-benceno})(\text{DMSO})]^{19}$. Este complejo inhibe la topoisomerasa II, uno de los enzimas clave en la replicación del ADN.

El grupo del profesor Sadler ha desarrollado complejos semi-sandwich del tipo $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{chel})\text{X}]^+$, donde chel es típicamente un ligando quelato diamino²⁰, [Figura 1.3] que presentan citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* comparable a la del cisplatino. Un mecanismo potencial para la activación de estos derivados comienza con la hidrólisis del enlace Ru-X, generando la especie activa Ru-OH₂. A continuación, el ligando agua es fácilmente desplazado por las biomoléculas. Ésta hipótesis explica la dependencia de la actividad biológica de estos compuestos con el pH, ya que para valores de pH mayores que pKa la especie predominante será Ru-OH, menos reactiva. De esta forma, para aductos acuosos con valores de pKas algo mayores que 7 se aseguraría que la especie activa predomine a pHs fisiológicos (7.2-7.4).

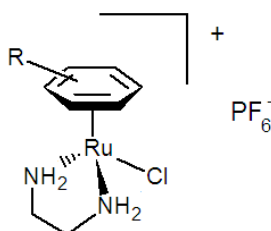


Figura 1.3: Ejemplo representativo de los compuestos semisandwich Ru (II)-areno

Si bien el mecanismo final se desconoce, se sabe que la citotoxicidad y la actividad *in vivo* de estos compuestos dependen, tanto de la naturaleza del ligando quelato, como de la del areno.

Algunos estudios realizados con compuestos de Ru sugieren que el Ru se une al ADN principalmente a través del N (7) de la guanina²¹. A parte de esta interacción

principal, Ru-N (base nucleica), la interacción con el ADN se ve favorecida por enlaces de hidrogeno entre oxígenos de la base nucleica y el NH del quelato, y por interacciones hidrofóbicas simultáneas del tipo π - π stacking entre la base y el ligando aromático²².

Otra familia de complejos Ru-areno con actividad anticancerígena es la de los complejos RAPTA (Rutenio Areno PTA) desarrollados por el grupo de Dyson²³ [Figura 1.4.b]. Estos complejos de rutenio (II) se caracterizan por su estructura semi-sandwich formada por un ligando η^6 -areno y, al menos, una fosfina soluble en agua (1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo [3.3.1.1]decano) (PTA) [Figura 1.4.a], coordinados al centro metálico. La coordinación de la PTA tiene como objetivo principal el aumento de la solubilidad y la estabilidad de los compuestos en condiciones fisiológicas.

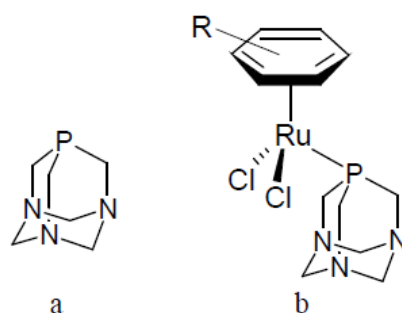


Figura 1.4. Fosfina PTA (a) y ejemplo representativo de los complejos RAPTA (b).

La fosfina PTA fue descrita por primera vez en 1974, por Daigle y *col*²⁴. Se trata de un compuesto sólido a temperatura ambiente y estable al aire. Esta fosfina presenta un ángulo cónico pequeño en comparación con otras fosfinas arílicas o alquílicas, 103°²⁶ frente a 118° (PMe₃), 145° (PPh₃) o 170° (PCy₃). Su solubilidad en agua a temperatura ambiente²⁵ se atribuye a la formación de puentes de hidrógeno N \cdots H con las moléculas de agua.

Los compuestos RAPTA son, normalmente, estables al aire y solubles en agua²⁷ y tanto los enlaces areno-Ru como los fosfina-Ru son generalmente estables. En

general, los complejos RAPTA son débilmente citotóxicos *in vitro*, pero muestran alta actividad antimetastática selectiva *in vivo*. Estudios realizados con el complejo RAPTA-C, $\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-C}_{10}\text{H}_{14})(\text{PTA})$, demostraron que su capacidad de interacción con el ADN es dependiente del pH^{23} . De este modo se observó que, mientras que a $\text{pH} > 7$ apenas se dañaba el ADN, a $\text{pH} < 7$ era frecuente encontrar daños. Esta dependencia del pH es la responsable de la selectividad de estos complejos, que inhiben el crecimiento de las células cancerígenas sin afectar a las células sanas. Esto se explica teniendo en cuenta que el pH en las células sanas es cercano a 7.2, mientras que las tumorales presentan un pH más bajo (6.8) debido a los cambios de metabolismo experimentados como consecuencia de los rápidos procesos de división celular. Estudios realizados con complejos RAPTA han probado que la hidrólisis de los ligandos Cl no es un paso imprescindible en la activación de estos compuestos, ya que pruebas realizadas con complejos sin tendencia a la acuación, con ligandos diferentes al Cl (oxalatos bidentados y dicarboxilatos), presentan citotoxicidades equiparables²⁸. Una explicación plausible es que la protonación de la PTA, que se produce a pH ácido, provoque la activación del complejo y sea responsable de la citotoxicidad. **[Figura 1.5]**

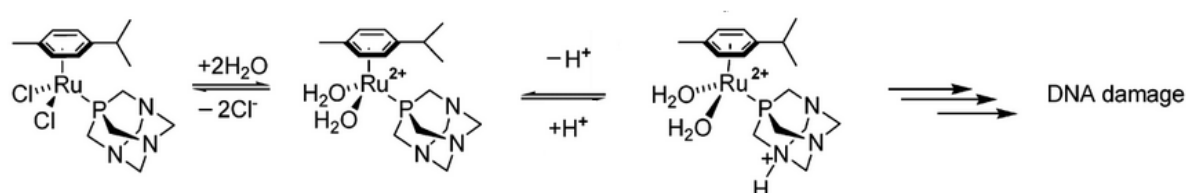


Figura 1.5: Protonación de la PTA, en compuestos RAPTA.

Estos compuestos exhiben mayor afinidad por moléculas proteicas que por el ADN, debido a las propiedades hidrofóbicas del areno. Así, se cree que interactúan con proteínas clave involucradas en el ciclo celular y alteran su expresión y actividad, lo que lleva finalmente a la apoptosis. Los ligandos coordinados al centro metálico permiten modular la actividad biológica de estos compuestos, por lo que se han llevado

a cabo diversos estudios modificándolos. Por ejemplo, la presencia de una segunda fosfina con propiedades hidrofóbicas, como PPh_3 , incrementa la citotoxicidad de los compuestos ²⁹.

Se ha comprobado que el tratamiento de PTA con electrófilos, por ejemplo metilos²⁵ o carboxilatos³⁰, que se unen a sus átomos de N [Figura 1.6] incrementa la toxicidad de los compuestos. Así, los compuestos con 1-Me-PTA son más tóxicos que los análogos con PTA, pero menos selectivos a la hora de discriminar entre células sanas y tumorales²⁹.

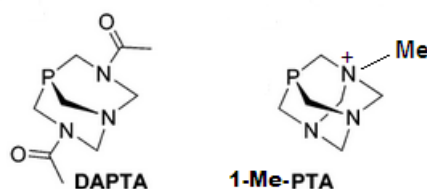


Figura 1.6: Ejemplos de fosfinas adamantano

La búsqueda de nuevos compuestos más activos y selectivos conduce a nuevas líneas de investigación. Así, una línea activa es, por ejemplo, la que busca una combinación entre los compuestos Ru-areno y la estructura del complejo NAMI-A, para lo que se incorpora al complejo semi-sandwich un ligando imidazol³¹ u otros ligandos nitrogenados similares^{32,32,33}. Las citotoxicidades obtenidas para estos compuestos son similares a las de los complejos RAPTA frente a las células cancerígenas³¹ [Figura 1.7].

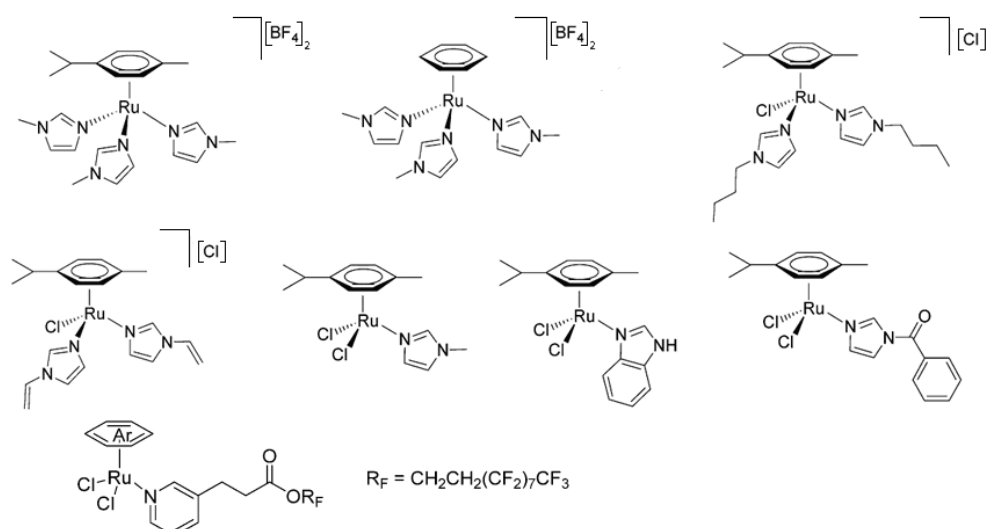


Figura 1.7: Ejemplos de los complejos Ru(II)-areno con ligandos tipo imidazol.

Otra opción es la de introducir en estos complejos un grupo biológicamente activo [Figura 1.8]. Un ejemplo son los complejos sintetizados por el grupo de Dyson³⁵, que consiguen anclar naftalimidias al complejo organometálico ya por medio de un grupo imidazol [Figura 1.8.b] o a través del areno [Figura 1.8.a]. El compuesto resultante es capaz de interactuar tanto con las proteínas (por parte del centro metálico) como con el ADN, (por parte de las naftalimidias).

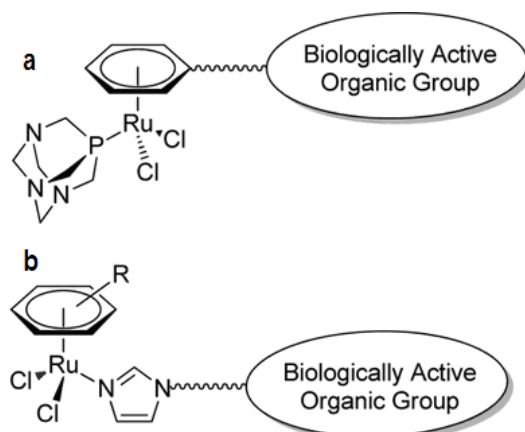


Figura 1.8: Dos propuestas para la unión de grupos orgánicos biológicamente activos a complejos Ru(II)-areno

Estas tendencias parecen señalar que la presencia de grupos nitrógeno-dadores en el entorno de coordinación del metal favorece la interacción de los complejos de Ru con las biomoléculas, incrementando sus propiedades antitumorales.

Nuestro grupo de investigación estudia la síntesis y reactividad de complejos semisandwich de rutenio (II) con ligandos fosfina y distintos ligandos auxiliares, como por ejemplo indenilo, p-cimeno o tris(pirazolil)borato (Tp)^{36,36,37}. En el caso de complejos con esqueletos tipo TpRu(PTA)³⁹ y Ru(pybox)⁴⁰ se ha estudiado su capacidad de interacción con el ADN y sus propiedades antitumorales. En este sentido, los complejos [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(PPh₃)(1-Me-PTA)][CF₃SO₃] y [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(NCMe)(PPh₃)(PTA)][PF₆], entre otros, resultaron muy interesantes, presentando citotoxicidades frente a diferentes líneas tumorales del orden de la doxorrubicina (fármaco antitumoral utilizado en la actualidad). Dado el alto interés en introducir ligandos N-dadores en complejos con actividad antitumoral, en este trabajo nos proponemos la síntesis de complejos TpRu(PTA)(N-dadores).

El ligando Tp o {HB(pz)₃} [Figura 1.9] fue descrito por primera vez por Trofimenko⁴¹ en 1966. Este ligando, de la familia de los escorpionato, se ha utilizado en la síntesis de múltiples y muy variados complejos con diferentes metales. Entre ellos, los complejos de rutenio son de los más frecuentes⁴².

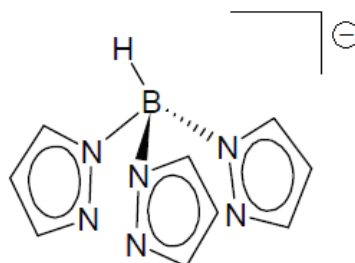


Figura 1.9: Ligando Tp

Este ligando se puede comparar con el ligando η^5 -ciclopentadienilo (Cp), ya que ambos son ligandos aniónicos de seis electrones y que ocupan tres posiciones de coordinación en torno al centro metálico. Sin embargo, existen diferencias en tamaños y propiedades electrónicas. Destaca especialmente el diferente ángulo cónico, siendo de 180° para el Tp frente a los 100° para el ligando Cp⁴².

1.1 OBJETIVOS

Basándonos en los resultados obtenidos por nuestro grupo y la investigación con ligandos N-dadores nos planteamos como objetivo de este trabajo la síntesis de nuevos complejos de Ru(II) con ligandos N-dadores que puedan presentar mayor actividad biológica que la de los compuestos con P-dadores ya estudiados en nuestro grupo.

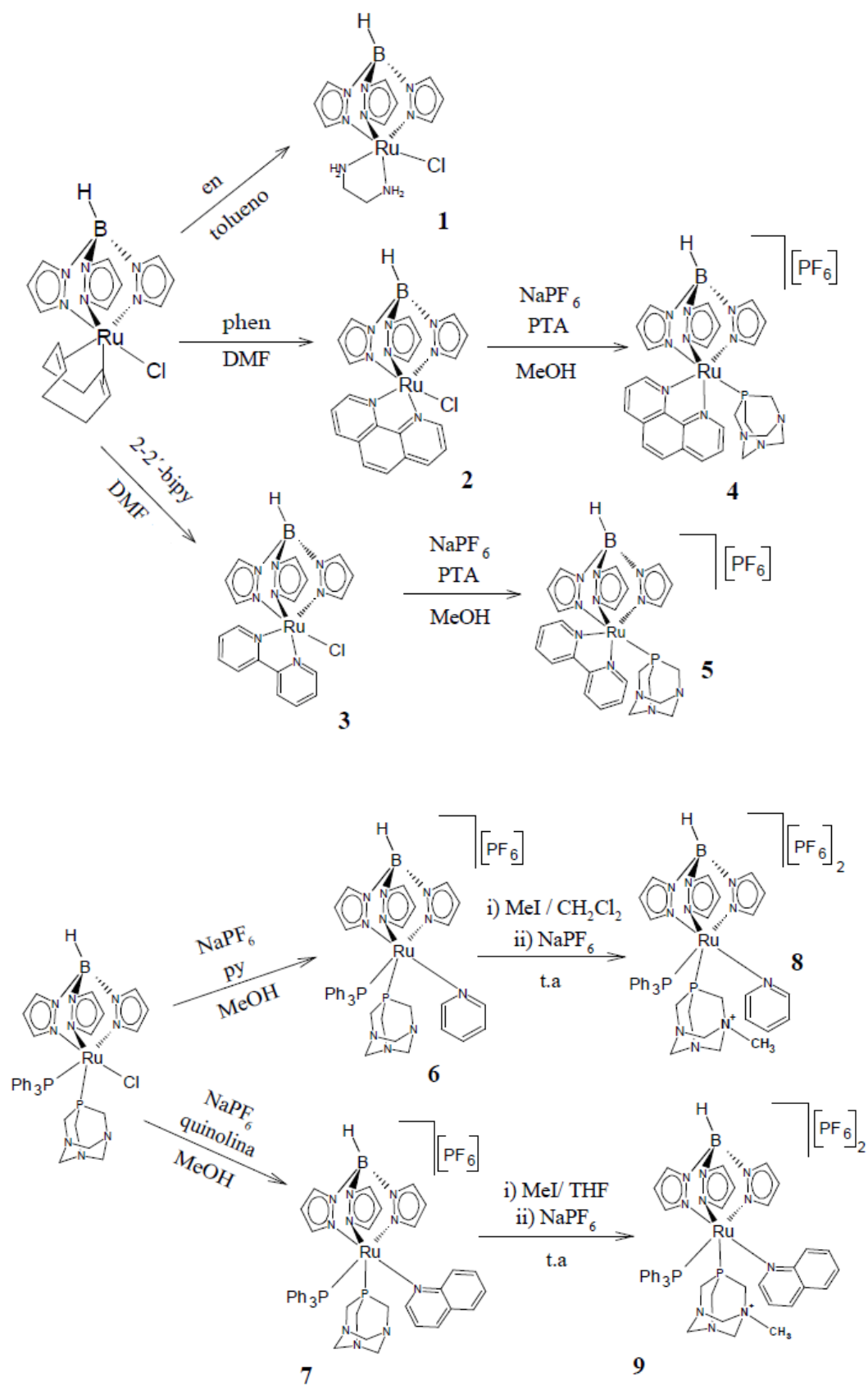
Así, en la presente *Memoria*, se aborda:

- a) Síntesis de nuevos precursores de Ru(II)-Tp con ligandos N-dadores bidentados.
- b) Síntesis de complejos de Ru(II)-Tp con ligandos N-dadores bidentados y una fosfina PTA, que mejore su solubilidad en agua.
- c) Síntesis de complejos semisandwich del tipo $[\text{Ru}(\text{Tp})(\text{PPh}_3)(\text{PTA})\text{N}]$, que presentan en la esfera de coordinación del Ru una fosfina PTA, hidrofílica, una fosfina PPh_3 hidrofóbica y ligandos nitrogenados monodentados (N).
- d) Estudio biológico de los compuestos sintetizados.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2 Discusión de resultados

ESQUEMA GENERAL DE REACCIONES



2.1 SÍNTESIS DE COMPLEJOS

HIDRUOTRIS(PIRAZOLIL)BORATO DE RUTENIO (II)

En la discusión de datos de RMN de protón y carbono-13 se utilizará para el ligando hidruotris(pirazolil)borato (Tp) la numeración de átomos recogida en la **Figura 2.1**.

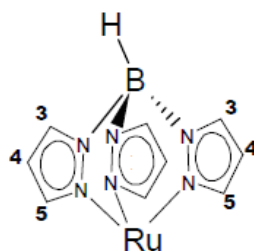
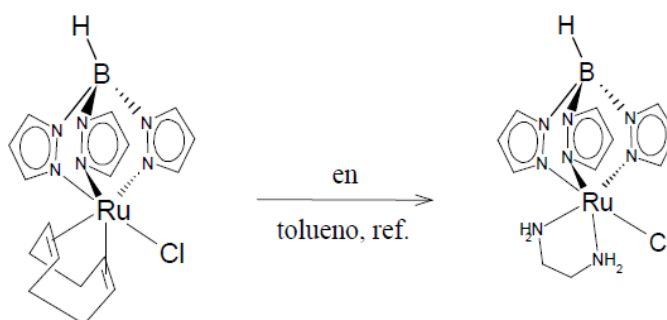


Figura 2.1: Numeración del Tp

2.1.1 Síntesis y caracterización del complejo $[\text{RuCl}\{\kappa^3(N,N,N)\text{-Tp}\}(\text{en})]$ (**1**)

La reacción del complejo $[\text{RuCl}\{\kappa^3(N,N,N)\text{-Tp}\}(\text{COD})]$ con un exceso de etilendiamina ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), en tolueno a temperatura de reflujo, durante dos horas y media, conduce a la formación del complejo $[\text{RuCl}\{\kappa^3(N,N,N)\text{-Tp}\}(\text{en})]$ (**1**), con un rendimiento del 60% (**Esquema 2.1**).



Esquema 2.1

El complejo **1** es un sólido marrón estable al aire, soluble en diclorometano y tolueno, e insoluble en éter dietílico y en hexano.

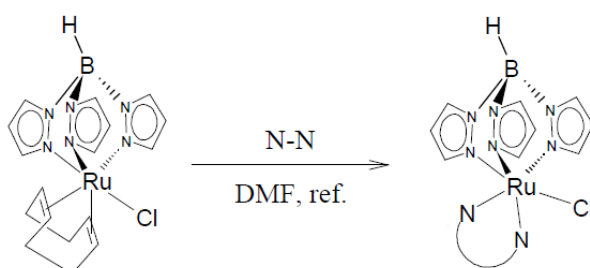
El espectro de IR muestra una señal de intensidad media a 2465 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de tensión del enlace B-H del ligando Tp.

En el espectro de RMN de protón del compuesto **1** las señales de los hidrógenos correspondientes al ligando Tp aparecen entre 8.18 y 6.23 ppm [Figura 2.1]. Así, se observan cuatro dobletes para los hidrógenos H^{3,5} a $\delta = 8.18, 8.05, 7.75$ y 7.62 ppm, y un multiplete a $\delta = 6.23$ ppm para los tres hidrógenos H⁴. Las demás señales corresponden a los hidrógenos de la etilendiamina coordinada al centro metálico. Aparecen como tres señales anchas, dos para los grupos CH₂, a $\delta = 3.34$ y 3.01 ppm, y la tercera y más ancha a $\delta = 1.91$ ppm para los hidrógenos de los grupos NH₂.

No se ha podido obtener una muestra analíticamente pura del compuesto, ya que descompone durante la purificación.

2.1.2. Síntesis y caracterización de complejos [RuCl{ κ^3 (N,N,N)-Tp}(N-N)] [N-N = phen (**2**), 2,2'-bipy (**3**)].

Cuando el complejo [RuCl{ κ^3 (N,N,N)-Tp}(COD)] se hace reaccionar con un exceso del ligando N-N correspondiente ([phen, C₁₂H₈N₂ (**2**)],[2,2'-bipy, C₁₀H₈N₂ (**3**))] en DMF a temperatura de reflujo del disolvente, a la media hora se puede apreciar que la disolución ha tomado un color morado. Transcurridas dos horas, la reacción se ha completado y los complejos [RuCl{ κ^3 (N,N,N)-Tp}(N-N)] (N-N = phen (**2**), 2,2'-bipy (**3**)) se obtienen con un rendimiento del 88% (**2**) y 80% (**3**), respectivamente.



N-N: phen (**2**), 2,2'-bipy (**3**)

Esquema 2.2

El compuesto **2** se aísla como un sólido morado y el complejo **3** como un sólido color granate-violáceo, ambos son estables al aire, solubles en diclorometano y tolueno e insolubles en hexano y éter.

Estos compuestos pueden ser obtenidos en tolueno, pero los rendimientos son considerablemente más bajos.

Los espectros de IR confirman la presencia del ligando Tp, ya que a 2480 cm^{-1} para el compuesto **2** y 2479 cm^{-1} para el compuesto **3** se puede observar la banda típica para la vibración de tensión del enlace B-H.

Tanto el espectro de resonancia de protón del complejo **2** como el del complejo **3** muestran el mismo patrón de señales para el ligando Tp, apareciendo todas ellas entre 8.25 y 5.6 ppms. Las señales para $\text{H}^{3,5}$ se observan como dos dobletes correspondientes a 2H a desplazamientos $\delta = 8.25$ y 7.93 ppm (**2**), $\delta = 8.17$ y 7.81 ppm (**3**) y un triplete aparente a $\delta = 6.48$ ppm (**2**), 6.39 ppm (**3**). Las señales para los hidrógenos H^4 se observan a $\delta = 7.72$, 5.79 y 5.70 ppm (**2**), 7.25 , 5.93 y 5.88 ppm (**3**).

Los espectros de protón de los complejos **2** y **3** muestran también las señales correspondientes a los ligandos N-dadores. Así, en el espectro de protón del compuesto **2** las señales correspondientes a los hidrógenos de la fenantrolina coordinada al centro metálico se presentan en la zona de los aromáticos, entre 9.24 y 7.70 ppm, como cuatro señales, cada una de ellas para 2H, dos dobletes aparentes a $\delta = 9.24$ y 8.33 ppm, un singulete a $\delta = 8.09$ ppm, y un multiplete a $\delta = 7.70$ ppm.

El espectro de protón del complejo **3** muestra tres señales, en el rango de 8.86-7.61 ppm, que reflejan los hidrógenos de la bipyridina. Dos dobletes a $\delta = 8.86$ y 8.23 ppm, que integran para 2H cada uno, y un multiplete a $\delta = 7.70$ ppm, que integra para 4H.

En los espectros de carbono-13 de ambos productos las señales de los carbonos del ligando Tp también aparecen con el mismo patrón, entre 144 y 105 ppm. Se observan 6 señales singulete, a $\delta = 144.4, 135.7$ y 106.7 ppm para el compuesto **2**, $144.1, 135.4$ y 106.6 ppm para el compuesto **3** y a $\delta = 139.7, 123.5$ y 105.0 ppm para el compuesto **2**, $140.1, 127.3$ y 105.4 ppm para el compuesto **3**, correspondientes a los carbonos C^{3,5} y C⁴ respectivamente.

Además en el espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ del complejo **2**, se pueden observar seis señales singulete, que pertenecen a la fenantrolina coordinada, cada una de ellas para 2C, a $\delta = 153.4, 136.1, 130.1, 128.8$ y 127.3 ppm.

Las señales de la bipyridina coordinada aparecen, en el espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ del complejo **3**, como 5 señales singulete, cada una correspondiente a 2C, a desplazamientos $\delta = 153.5, 151.4, 133.2, 124.3$ y 122.0 ppm.

Esta reacción se llevó a cabo utilizando otros ligandos monodentados N-dadores con implicaciones biológicas. Se utilizó adenina, 7-aminoflavona y 7-amino-2-metilcromona. Sin embargo, estas pruebas fueron infructuosas, ya que en ningún caso se obtuvieron los productos deseados.

Para estudiar su actividad biológica también se preparó el compuesto $[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{tmeda})]$ (**10**), que ya había sido obtenido anteriormente y descrito en la bibliografía⁴⁴.

Ya que nuestra intención es estudiar la actividad biológica de los complejos sintetizados y los ensayos se llevan a cabo en medios acuosos a pHs fisiológicos, es importante tener en cuenta la solubilidad de los compuestos en agua, puesto que es un factor imprescindible para realizar las pruebas biológicas. Las solubilidades de los compuestos obtenidos, se recogen en la **Tabla 2.1**

Compuesto	Solubilidad (H ₂ O, 20°C)(mg/ml)
[RuCl{κ ³ (N,N,N)-Tp}(en)] (1)	2.4
[RuCl{κ ³ (N,N,N)-Tp}(phen)] (2)	0.2
[RuCl{κ ³ (N,N,N)-Tp}(2,2'-bipy)] (3)	0.7
[RuCl{κ ³ (N,N,N)-Tp}(tmda)] (10)	1.4

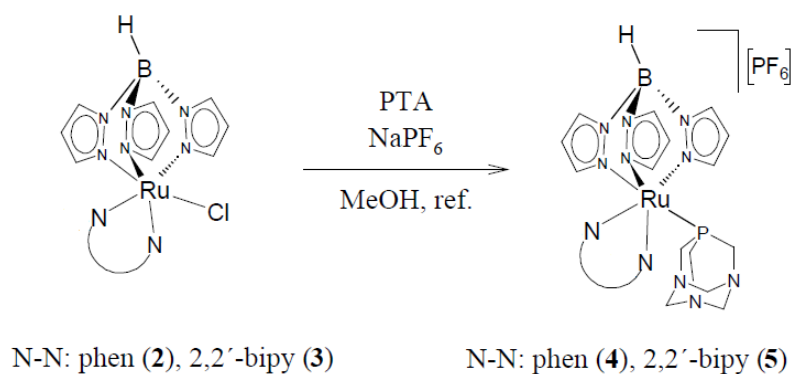
Tabla 2.1: Solubilidad en agua, a 20°C, de los compuestos preparados

Como se puede observar, las solubilidades son bajas, especialmente las de los complejos con bipyridina y fenantrolina. Para aumentar la solubilidad de los complejos se consideró la introducción de ligandos hidrosolubles utilizando un abstractor de halogenuros. Así, se ensayaron diversas reacciones para introducir las fosfinas hidrosolubles PTA y TPPMS (3-difenilfosfinobencenosulfonato de sodio) en los complejos sintetizados.

Los intentos de coordinar la fosfina TPPMS a los complejos **2**, **3** y **10** en presencia de un abstractor de halogenuros no dieron resultado, en el caso del complejo **2** por dar lugar a una mezcla de productos y en el caso de los complejos **3** y **10** porque no hubo reacción. La reacción para introducir el ligando fosfina PTA en el complejo **10** tampoco tuvo lugar.

2.1.3. Síntesis y caracterización de los complejos [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(N-N)(PTA)][PF₆] [N-N = phen (**4**), 2,2'-bipy (**5**)].

Al hacer reaccionar los complejos [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(N-N)] [N-N = phen (**2**), 2,2'-bipy (**3**)] con la fosfina PTA y un exceso de NaPF₆, que actúa como abstractor de cloruros, durante 6 h. en metanol a temperatura de reflujo, se obtienen los complejos [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(N-N)(PTA)][PF₆] [N-N = phen (**4**), 2,2'-bipy (**5**)], con rendimientos del 74 y el 75% respectivamente.



Esquema 2.3

Los compuestos **4** y **5** se obtienen como sólidos marrón solubles en diclorometano y metanol, e insolubles en hexano y éter.

Los espectros de IR presentan la banda de tensión del enlace B-H del ligando Tp a 2482 (**4**) y 2479 (**5**) cm^{-1} respectivamente.

En el espectro de fósforo-31 de ambos complejos, se observa una señal singulete a $\delta = -31.6$ (**4**), -32.0 ppm (**5**), correspondiente a la PTA, así como un septuplete centrado en $\delta = -143.8$ ppm (**4**), -144.5 ppm (**5**) que pertenece al $[\text{PF}_6]^-$, que actúa como contra anión del complejo catiónico.

Los espectros de protón se pone de manifiesto la presencia de la PTA por las señales de los hidrógenos NCH_2N , que aparecen como dos dobletes de un sistema AB de segundo orden, cada uno para 3H, a $\delta = 4.36$ y 4.15 ppm (**4**), $\delta = 4.45$ y 4.33 ppm (**5**), con constantes de acoplamiento del orden de 13 Hz. Así mismo, los hidrógenos NCH_2P , aparecen como una única señal singulete a $\delta = 3.39$ ppm (**4**), 3.52 ppm (**5**), para 6H. El resto de las señales aparecen en la zona de los aromáticos y son similares a las de los compuestos de partida **2** y **3**.

En los espectros de carbono-13, las señales de la PTA coordinada aparecen como dos dobletes a $\delta = 73.0$ (**4**) y 73.3 (**5**) ppm, con $^3J_{\text{CP}}=6$ para los carbonos NCH_2N , y a $\delta = 50.2$ (**4**) y 50.4 (**5**) ppm, para los carbonos NCH_2P , con constantes de acoplamiento

del orden de $J_{CP}=14$ Hz. Las demás señales de los espectros de $^{13}C\{^1H\}$ son aromáticas y con patrones parecidos a los de los complejos iniciales, (2) y (3).

Una vez obtenidos los compuestos, se midió su solubilidad en agua a 20°C, los datos se recogen en la **Tabla 2.2**. Como se puede observar comparando los datos de la tabla 2.2 con los de la tabla 2.1, la solubilidad de los compuestos con fenantrolina y bipyridina aumentó notablemente al coordinarse la fosfina PTA, tal y como se esperaba.

Compuesto	Solubilidad (H ₂ O, 20°C)(mg/ml)
[RuCl{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(phen)(PTA)] (4)	1.3
[RuCl{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(2,2'-bipy)(PTA)] (5)	1.9

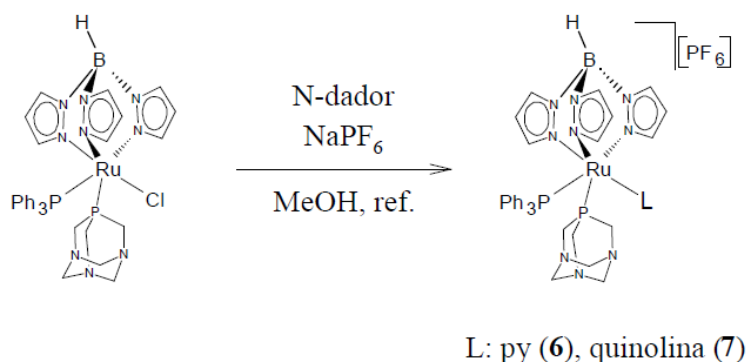
Tabla 2.2

Dada la influencia de los ligandos coordinados al centro metálico sobre la actividad biológica de los complejos organometálicos, y puesto que algunos estudios indican que ligandos hidrofóbicos, como PPh₃, aumentan la actividad antitumoral²⁹, decidimos sintetizar complejos que presentasen en la esfera de coordinación del rutenio un ligando hidrófilo, PTA, un ligando hidrófobo PPh₃ y un ligando N-dador monodentado. Para ello, se utilizó como compuesto de partida el complejo [RuCl{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(PPh₃)(PTA)].

2.1.4 Síntesis y caracterización de complejo [Ru{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(PPh₃)(PTA)(L)][PF₆] [L = N-dadores = py (6), quinolina (7)].

La reacción del complejo [RuCl{ $\kappa^3(N,N,N)$ -Tp}(PPh₃)(PTA)] con un exceso de NaPF₆ (abstractor de cloruros) y un exceso del ligando N-dador monodentado correspondiente [L = py (6), quinolina (7)], en MeOH a temperatura de reflujo, durante

6 h. conduce a la formación de los complejos $[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})(\text{L})]$ $[\text{L} = \text{py}$ (**6**), quinolina (**7**)] con rendimientos del 90% y 74% respectivamente.



Esquema 2.4

Los compuestos **6** y **7** se obtienen como un sólido blanco amarillento y un sólido amarillo anaranjado, respectivamente. Son solubles en diclorometano y THF e insolubles en hexano y éter.

Los espectros de IR de estos compuestos muestran la banda de tensión del enlace B-H del ligando Tp a 2486 cm^{-1} (**6**) y 2483 cm^{-1} (**7**).

En los espectros de fósforo-31 de ambos complejos se pueden observar dos dobletes debido al acoplamiento entre los dos átomos de fósforo presentes en la molécula. En la región a campos altos a $\delta = -43.8$ (**6**) y -24.2 (**7**) ppm aparece la señal de fósforo de la fosfina PTA, mientras que la señal del átomo de fósforo del ligando PPh_3 aparece mucho más desapantallado, a 41.3 ppm, para ambos complejos. La constante de acoplamiento entre los fósforos tiene, en ambos casos, un valor de ${}^2J_{\text{PP}} = 30\text{ Hz}$. Además, aparece el septuplete correspondiente al anión $[\text{PF}_6]^-$ centrado en $\delta = -144.3$ (**6**) y -145.8 ppm (**7**) respectivamente.

Los espectros de protón de ambos compuestos presentan un patrón de señales para el Tp similares a las de los compuestos anteriormente descritos. En la zona de aromáticos aparecen las señales debidas a la PPh_3 , en el rango $\delta = 7.48\text{-}7.22\text{ ppm}$ (**6**), δ

= 7.53-7.12 ppm (**7**) y las señales de los ligandos N-dadores. Las señales de los hidrógenos de la piridina aparecen en el espectro de protón del compuesto **6**, como tres señales: un singulete ancho $\delta = 8.10$ ppm, y dos dobletes a $\delta = 7.97$ y 7.89 ppm. Las señales debidas a los hidrógenos de la quinolina aparecen, en el espectro del compuesto **7**, como un singulete ancho a $\delta = 8.89$ ppm y un multiplete entre $\delta = 8.28 - 7.87$ ppm.

Las señales de la PTA coordinada se observan como dos dobletes de un sistema de spin AB de segundo orden, para los hidrógenos NCH₂N, cada uno para 3H, a $\delta = 4.46$ y 4.23 ppm (**6**), $\delta = 4.74$ y 4.52 ppm (**7**), con constantes de acoplamiento del orden de 13 Hz. Los hidrógenos NCH₂P aparecen, esta vez, como otros dos dobletes de un sistema de spin CD, cada uno para 3H a $\delta = 3.44$ y 3.30 ppm (**6**), $\delta = 4.09$ y 3.89 ppm (**7**), con constantes de acoplamiento del orden de 14 Hz.

El espectros de carbono-13 del complejo **6** muestra, para los carbonos del ligando Tp, 9 señales distintas, cada una para 1C, $\delta = 147.7$, 145.2 y 144.4 ppm (C^{3,5}), $\delta = 137.9$, 137.2 y 136.9 ppm (C^{3,5}) y $\delta = 108.5$, 108.1 y 106.8 ppm (3C, C⁴). Las señales pertenecientes a los carbonos de la piridina aparecen como tres singuletes, dos de ellos para 2C $\delta = 149.3$ y 125.6 ppm, y uno para 1C a $\delta = 140.7$ ppm. Las señales de los carbonos de la PPh₃ aparecen como cuatro señales, una de ellas como un doblete debido al acoplamiento C-P, con una constante de acoplamiento del orden de ${}^3J_{CP} = 9$ Hz, $\delta = 136.2$ (3C), 133.8 (d, 6C), 130.2 ppm (3C), 128.5 (3C cuat.). Las señales de la PTA coordinada aparecen también como dobletes, a $\delta = 71.13$ ppm, para NCH₂N, con ${}^3J_{CP} = 6$ Hz, y a $\delta = 48.6$ ppm, para NCH₂P, con $J_{CP} = 13$ Hz.

Para el compuesto **7** no se pudo obtener un espectro fiable de carbono-13, debido a su limitada estabilidad en disolventes clorados.

Con el fin de realizar estudios biológicos de los complejos obtenidos se midió su solubilidad en agua a 20°C. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 2.3**.

Compuesto	Solubilidad (H ₂ O, 20°C)(mg/ml)
[Ru{κ ³ (N,N,N)-Tp}(PPh ₃)(PTA)(py)] (6)	2.3
[Ru{κ ³ (N,N,N)-Tp}(PPh ₃)(PTA)(quinolina)] (7)	1.0

Tabla 2.3

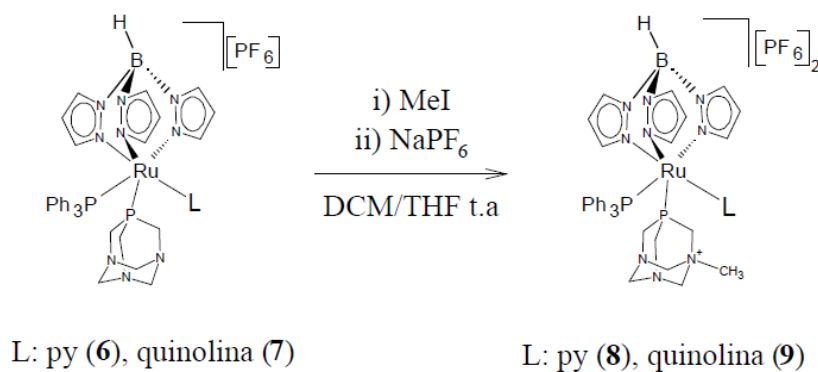
Las solubilidades de estos complejos son similares a las de los complejos (**4**) y (**5**) con PTA descritos anteriormente.

Al igual que en el caso de la reacción para dar los compuestos **2** y **3**, esta reacción se intentó también con ligandos N-dadores con implicaciones biológicas, como la adenina, la 7-amino-2-metilcromona, la 7 y la 6-aminoflavona, pero no se encontraron las condiciones óptimas para obtener los productos buscados.

Por último, para estudiar los efectos que podrían tener las modificaciones en la fosfina PTA en estos derivados, se realizó la metilación de uno de los N de dicha fosfina en estos mismos complejos.

2.1.5 Síntesis y caracterización de complejos [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(PPh₃)(1-Me-PTA)(L)][PF₆]₂ [L = py (**8**), quinolina (**9**)].

La reacción de los complejos [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(PPh₃)(PTA)(L)] [L = N-dadores = py (**6**), quinolina (**7**)] con un exceso de yodometano en DCM (**6**) o THF (**7**) durante tres días y a temperatura ambiente, conduce respectivamente a los complejos [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(PPh₃)(1-Me-PTA)(L)]²⁺ [L = py (**8**), quinolina (**9**)]. La adición a la mezcla de reacción de NaPF₆ permite aislar los compuestos como las sales de hexafluorofosfato con rendimientos del 65 y el 45% respectivamente.



Esquema 2.5

El complejo **8** se aísla como un sólido de color pardo y el **9** como un sólido verde amarillento, ambos son solubles en DCM y en THF, e insolubles en hexano.

Los espectros de IR muestran la banda de tensión del enlace B-H del ligando Tp a 2486 (**8**) y 2484 (**9**) cm^{-1} respectivamente.

La cuaternización de uno de los átomos de nitrógeno de la fosfina PTA en los complejos **6** y **7** da lugar a cambios muy significativos en el patrón de señales correspondientes a los átomos de este ligando en los espectros de fósforo-31, protón y carbono-13.

Los espectros de fósforo-31 presentan dos dobletes, $\delta = 37.8$ (**8**) y 40.7 (**9**) ppm (PPh_3), a desplazamientos similares a los de los productos sin metilar, y $\delta = -24.74$ (**8**) y -13.5 (**9**) ppm (PTA), que muestran un desapantallamiento considerable respecto a las señales de los productos de partida (-43.8 (**6**) y -24.2 (**7**) ppm), como es típico en estos procesos³⁹. Las constantes de acoplamiento tienen valores de $^2J_{\text{PP}} = 30$ Hz. También se observa el septuplete debido al PF_6^- centrado a $\delta = -143.3$ ppm (**8**), $\delta = -144.3$ ppm (**9**).

Por otra parte, además de estos efectos electrónicos, la metilación de la fosfina PTA rompe la simetría de este ligando. Debido a ello, los espectros de protón y carbono-13 presentan patrones más complicados, como consecuencia de la inequivalencia magnética de los núcleos presentes.

En los espectros de protón de los compuestos **8** y **9** los hidrógenos de la 1-Me-PTA se encuentran en el intervalo 5.08-3.04, y aparecen como una sucesión de multipletes. La señal singlete para los hidrógenos del grupo metilo aparecen a $\delta = 2.67$ (**8**) y 2.66 (**9**) ppm.

En los espectros de carbono-13 las señales correspondientes a la 1-Me-PTA entre 80.5 y 46.7 ppm. Los carbonos de los grupos NCH₂N aparecen como dos singletes a $\delta = 80.5$ y 69.6 (**8**) ppm y 78.6 y 70.2 (**9**) ppm y 69.6 ppm. Los carbonos NCH₂P aparecen como singletes anchos a $\delta = 46.9$ y 46.7 (**8**) y 48.2 y 46.9 (**9**) ppm. El carbono CH₃NCH₂P sale a $\delta = 55.2$ (**8**) y 57.7 (**9**) ppm. El carbono del grupo metilo se observa a $\delta = 49.4$ (**8**) y 51.8 (**9**) ppm.

Para poder realizar los estudios biológicos de estos compuestos, se midió su solubilidad en agua a 20°C, los datos obtenidos se recogen en la **Tabla 2.4**.

Compuesto	Solubilidad (H ₂ O, 20°C)(mg/ml)
[Ru{ κ^3 (N,N,N)-Tp}(PPh ₃)(1-Me-PTA)(py)][PF ₆] ₂ (8)	1.2
[Ru{ κ^3 (N,N,N)-Tp}(PPh ₃)(1-Me-PTA)(quinolina)] [PF ₆] ₂ (9)	1.7

Tabla 2.4

Como se puede apreciar en la tabla, las solubilidades de estos complejos son del mismo orden que las de los complejos de partida (**Tabla 2.3**). Sin embargo, la variación depende del complejo, observándose para el complejo con piridina (**6**) una disminución de la solubilidad al metilar la PTA, mientras para el compuesto con quinolina (**7**) se observa un incremento.

2.2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.2.1. Interacción con el ADN, estudio del retardo de la movilidad en gel de un plásmido

Los cambios en la movilidad de un plásmido de ADN a través de un gel de agarosa, tras ser sometido a un proceso de electroforesis, permiten evaluar la interacción con el ADN de un compuesto de coordinación, ya que un retardo en la migración del plásmido, previamente incubado con un complejo metálico, puede ser interpretado como una evidencia directa de esta interacción.

En este contexto, siguiendo el protocolo descrito en la Parte Experimental, se llevó a cabo el estudio de la interacción con el plásmido pBR322 (4361 pares de bases) de los complejos anteriormente descritos.

Para cada complejo evaluado, se prepararon una serie de disoluciones de diferente concentración, que fueron incubadas frente a una concentración constante de plásmido en una disolución tampón fosfato 10 mM a pH 7.0, durante 24h a 37°C. Cada muestra fue analizada por electroforesis en gel, la fotografía del gel obtenido para los compuestos **1-10** se pueden observar en la **Figura 2.1**.

En la parte superior de cada gel de la **Figura 2.1** se encuentra la concentración de complejo en cada calle, expresadas en mM.

Como se observa en la figura, solo los complejos **1, 7, 8 y 9** muestran un retardo en la movilidad del plásmido, reflejando interacción con el ADN. Estos complejos únicamente muestran un retardo a las concentraciones más altas. El resto de los complejos no interaccionan con el ADN, pero podría deberse a la baja solubilidad que presentan en agua. Cabe destacar que la interacción de los compuestos con el ADN no depende exclusivamente de su solubilidad, porque, como se puede apreciar en las

fotografías, el complejo **6** no modifica la movilidad del plásmido, mientras que complejos como el **7** o el **9**, menos solubles, si lo hacen.

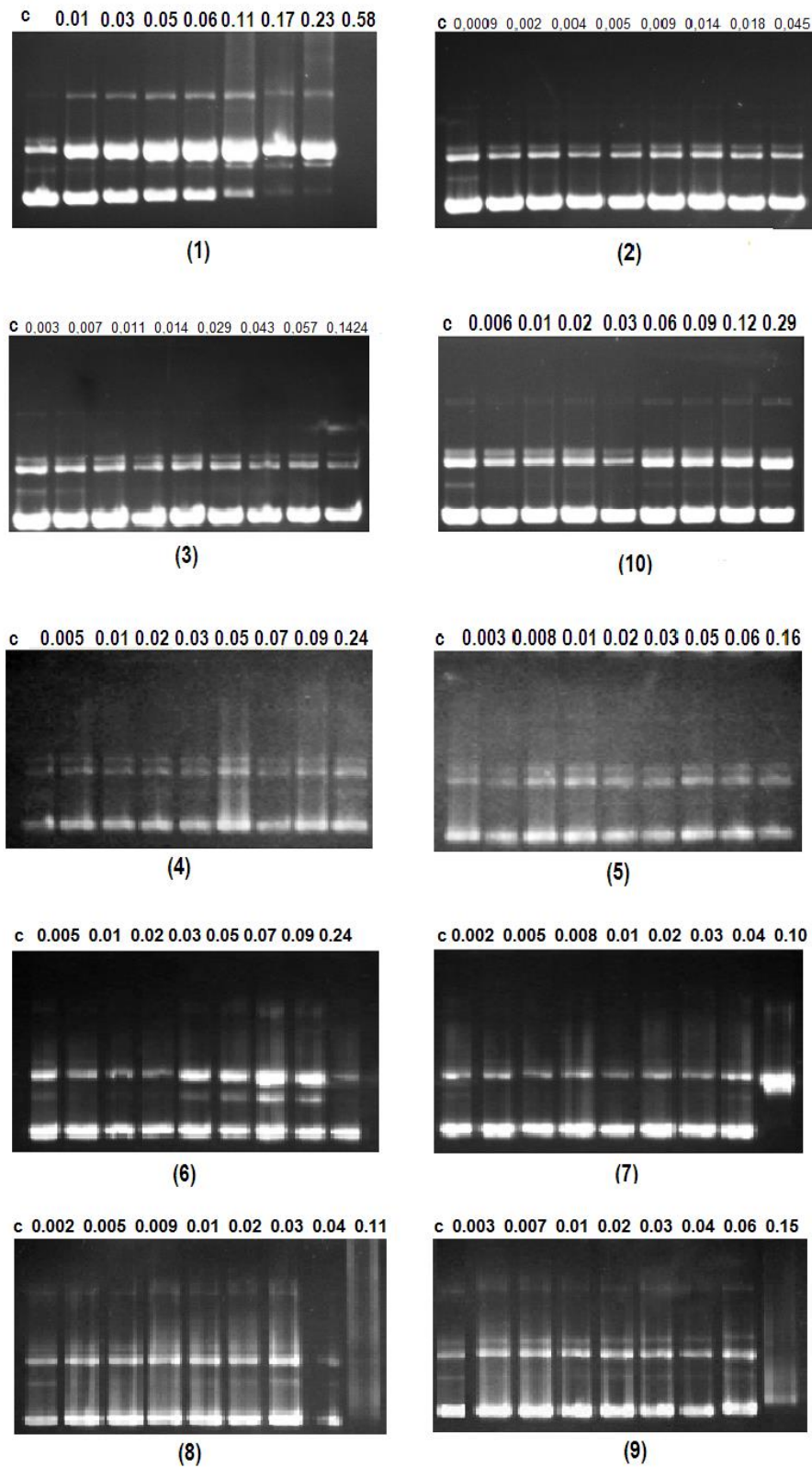


Figura 2.1: Ensayos de retardo de la movilidad electroforética del plásmido pBR322 por los complejos 1-10. En la parte superior de cada gel se muestran las concentraciones de complejo empleadas en cada caso (Mm). C es una muestra control de plásmido sin complejo de rutenio.

El mecanismo propuesto para la activación de los compuestos de platino se basa en la interacción con el ADN. En el caso de los complejos Ru-areno los mecanismos de activación no se conocen con certeza, sin embargo para estos compuestos se han descrito otras dianas biológicas, como en el caso de los complejos RAPTA, que tienen mayor afinidad por proteínas y biomoléculas que por el ADN, o el complejo [RuCl₂(η⁶-benceno)(DMSO)] que inhibe la topoisomerasa II. Por eso, aunque los complejos sintetizados no muestren gran interacción con el ADN, como se ha observado en los geles, se ha llevado a cabo un ensayo para estudiar su posible actividad antitumoral frente a líneas celulares cancerígenas.

2.2.2. Estudio de la actividad antitumoral por citometría de flujo

Se ha estudiado la actividad antitumoral de los compuestos de rutenio sintetizados mediante el estudio del ciclo celular por la técnica de citometría de flujo. Para ello, se ha elegido el ensayo de la Anexina V-FITC y la tinción con yoduro de propidio, que generan fluorescencias de diferentes colores, para analizar la inducción de la apoptosis en células tumorales.

La apoptosis es un proceso de muerte celular en el que la integridad de la membrana se mantiene y continúa siendo semipermeable pero se observan cambios en su simetría. Un evento temprano que ocurre en la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática⁴⁹. Por ejemplo, la fosfatidil serina, molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula, se expone hacia el exterior de la membrana celular cuando la célula entra en el proceso de muerte por apoptosis. La anexina V es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana y que tiene una alta afinidad por la fosfatidil serina, por lo que las células que se hallan en

apoptosis que son las que exteriorizan la fosfatidil serina, se encontrarán marcadas con anexina V. La anexina V no es una molécula fluorescente, por lo que su localización en las células se consigue marcándola con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína). Experimentalmente, la detección de la fluorescencia de la anexina V-FITC en células apoptóticas se puede acompañar de una tinción con yoduro de propidio, cuya diana es el ADN del núcleo celular. Cuando la célula se encuentra muy dañada, pierde la integridad de su membrana y el yoduro de propidio es capaz de penetrar en ella y unirse al ADN, lo cual indica que se encuentra en una fase tardía de apoptosis y/o necrosis secundaria. Por ello, la tinción simultánea con anexina V-FITC y yoduro de propidio, permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular (se detecta únicamente fluorescencia por anexina V-FITC) o si se encuentra en una etapa tardía o necrosis, detectándose principalmente fluorescencia por yoduro de propidio.

Establecida la base del ensayo, se ha procedido al estudio de la capacidad antitumoral de los compuestos de rutenio sintetizados frente a una línea celular de cáncer cérvico-uterino (HeLa).

Las células se han incubado con disoluciones de concentración 10 μM de los complejos **4-9** durante 72 horas, tras las cuales se han sometido a diversos tratamientos para, finalmente, ser marcadas con Anexina V-FITC y yoduro de propicio y se ha analizado el contenido de células apoptóticas por fluorescencia mediante citometría de flujo.

En la **Figura 2.2** se recogen las representaciones biparamétricas en 2D (diagrama de puntos) obtenidas para los compuestos de rutenio con PTA en concentración 10 μM frente a células HeLa. En la parte superior se muestra un control de células sin tratar. Estos diagramas permiten observar las células o eventos distribuidos como una función

de la intensidad de la señal con respecto a cada parámetro, en este caso, las fluorescencias relativas de la anexina V-FITC (eje de abcisas) y del yoduro de propidio (eje de ordenadas). De esta manera, en el cuadrante N3 las células son negativas para ambas fluorescencias, por tanto, células viables. En el cuadrante N4 son positivas para la fluorescencia de la anexina V-FITC y negativas para la fluorescencia del yoduro de propidio, lo que indica células en procesos de apoptosis temprana. En el cuadrante N2 son positivas para ambas fluorescencias, es decir, células en apoptosis tardía. Por último, en el cuadrante N1 son positivas para la fluorescencia del yoduro de propidio y negativas para la fluorescencia de la anexina V-FITC, y por tanto células necróticas.

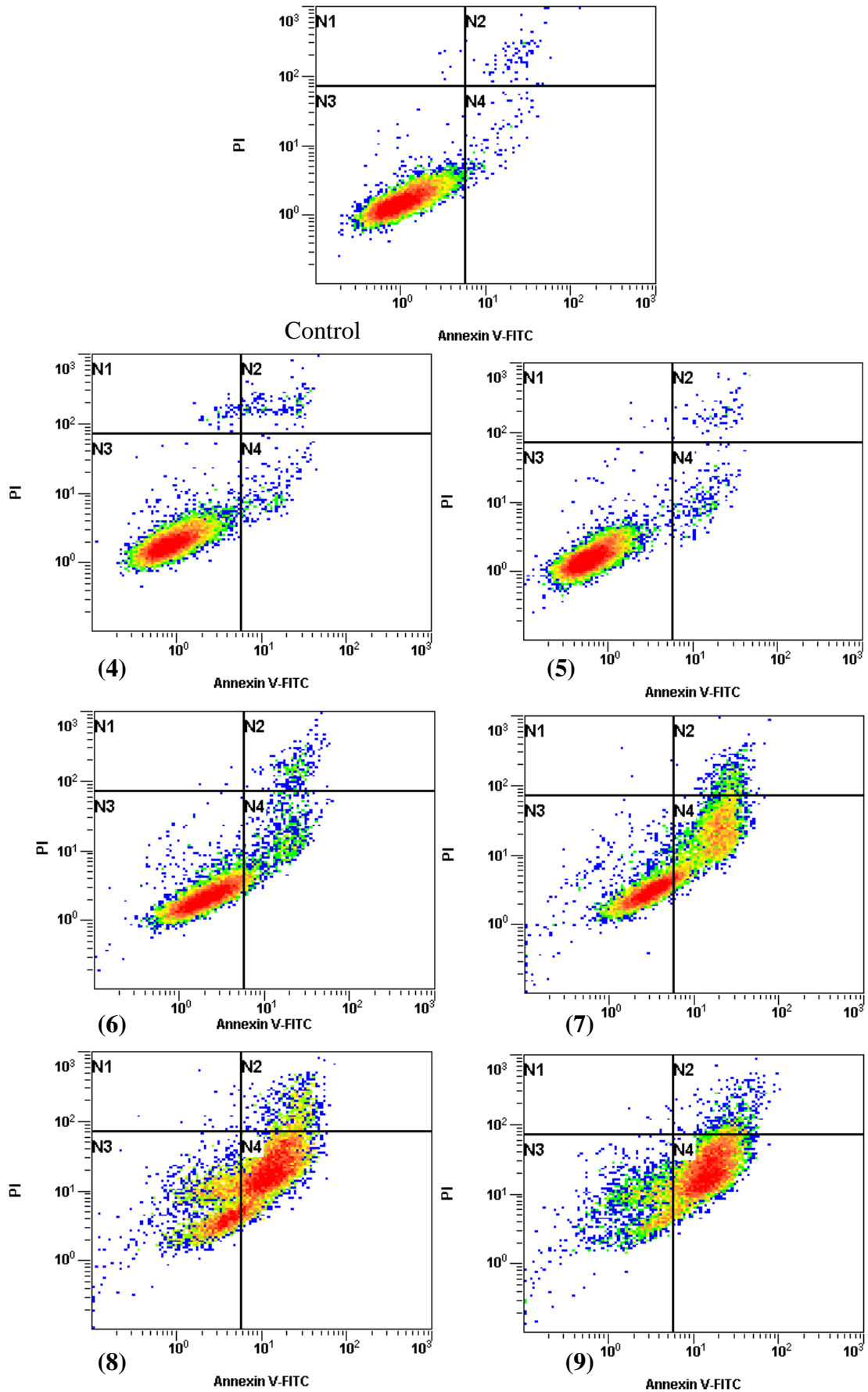


Figura 2.2: Cuantificación por citometría de flujo de células apoptóticas por exposición durante 72 h a disoluciones 10 μ M de los compuestos: 4-9. En la parte superior se muestra un control de células HeLa sin tratamiento con compuesto

Como se observa en la figura, para concentraciones de 10 μM los compuestos **7**, **8** y **9** inducen apoptosis en una población de células HeLa considerable (45, 68 y 79%). En la **Tabla 2.5** se recogen los porcentajes obtenidos para todos los compuestos estudiados.

Compuesto	Población celular (%)		
	N2	N4	N2+N4
Control (sin tratar)	0.70	1.07	1.77
$[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{phen})(\text{PTA})][\text{PF}_6]$ (4)	1.25	1.84	3.09
$[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(2,2'\text{-bipy})(\text{PTA})][\text{PF}_6]$ (5)	0.71	2.04	2.75
$[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})(\text{py})][\text{PF}_6]$ (6)	2.48	10.41	12.89
$[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})(\text{quinolina})][\text{PF}_6]$ (7)	4.39	41.01	45.40
$[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-Me-PTA})(\text{py})][\text{PF}_6]_2$ (8)	7.22	61.21	68.43
$[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-Me-PTA})(\text{quinolina})][\text{PF}_6]_2$ (9)	5.38	74.03	79.41

Tabla 2.5: Porcentaje de células HeLa en apoptosis por acción de los complejos

4-9 [10 μM].

Estos resultados indican que los complejos **8** y **9** son los que promueven la apoptosis en mayor medida. Así, el 74% y 61% de las células se encuentran en proceso de apoptosis temprana, para **9** y **8** respectivamente.

El complejo **7** también induce una apoptosis apreciable, 45.4% del total de las células se encuentran en procesos de apoptosis. Así, se puede observar que los dos complejos con mayor citotoxicidad son los complejos que presentan la fosfina PTA metilada. Esto concuerda con resultados descritos anteriormente en la bibliografía²⁹, como en el caso de los compuestos $[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-Me-PTA})][\text{OTf}]$ y $[\text{RuH}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-Me-PTA})][\text{OTf}]$, anteriormente sintetizados y estudiados en nuestro grupo, que resultaron más citotóxicos que sus análogos con la fosfina PTA sin metilar³⁹. También se puede concluir que los complejos con quinolina son más activos que los complejos que contienen piridina. Por otra parte, los complejos

con PPh₃ parecen inducir mayores niveles de apoptosis que los complejos con ligandos N-dadores bidentados y PTA.

El hecho de que los resultados observados para la interacción con ADN no coincidan con los resultados de la citometría parece indicar que existen mecanismos de interacción diferente de la interacción directa al ADN, y puede deberse a la interacción de los complejos sintetizados con proteínas o enzimas necesarias para la división celular, que sería necesario estudiar por otros métodos.

Los efectos inducidos en las células por los complejos se pueden observar también utilizando la técnica de microscopía electrónica. En la **Figura 2.3** se pueden observar algunas de las células en procesos de apoptosis inducidos por los complejos **8** y **9**. Se puede apreciar el deterioro de las células (B), así como la fluorescencia debida a la anexinaV-FITC (A).

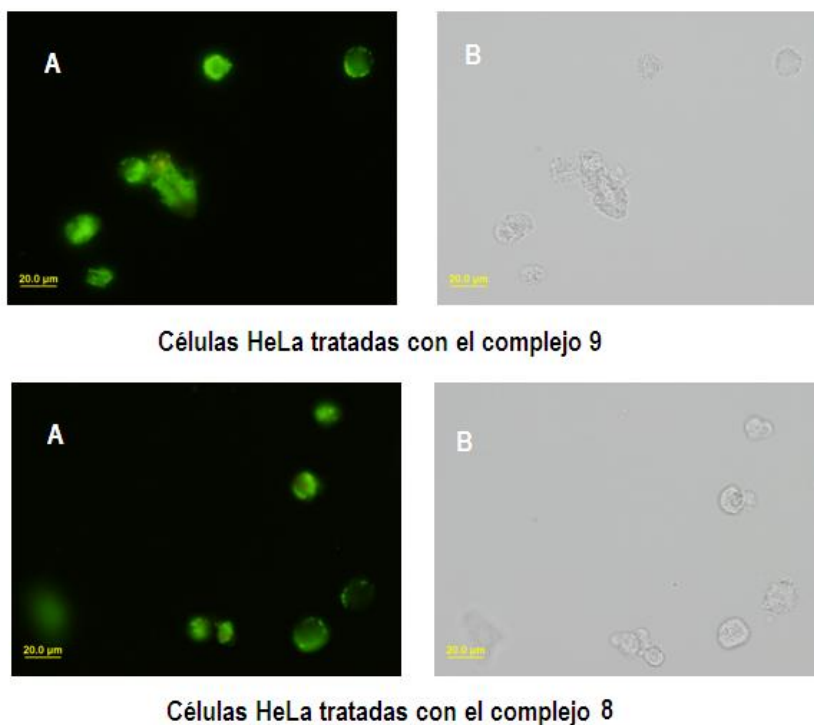


Figura 2.3: Imágenes de células HeLa tratadas con los complejos **8** y **9**, tomadas con un microscopio de fluorescencia en modo fluorescencia (A) y transmisión (B).

2.3. CONCLUSIONES

En este trabajo:

- a) Se han sintetizado nuevos complejos de rutenio(II) con el ligando Tp y ligandos N-dadores bidentados. La introducción en la esfera de coordinación de estos compuestos de un ligando PTA aumenta su solubilidad en agua, permitiendo así el estudio de su actividad citotóxica.
- b) Se han sintetizado nuevos complejos de rutenio(II) con el ligando Tp, $[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})(\text{L})][\text{PF}_6]$ que poseen un ligando hidrófilo, PTA o 1-Me-PTA, uno hidrófobo, PPh_3 y un ligando N-dador monodentado.
- c) Se ha estudiado la actividad biológica de estos compuestos, tanto por el retardo en la movilidad de un plásmido en un gel (interacción con el ADN), como por citometría de flujo (inducción de apoptosis en células tumorales). A pesar de la baja interacción con el ADN de los complejos sintetizados, se ha observado una alta citotoxicidad para los complejos $[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})(\text{quinolina})][\text{PF}_6]$ (**7**), $[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-Me-PTA})(\text{py})][\text{PF}_6]_2$ (**8**) y $[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-Me-PTA})(\text{quinolina})][\text{PF}_6]_2$ (**9**).
- d) Se ha concluido que los complejos con 1-Me-PTA son los que inducen en mayor grado apoptosis.

PARTE EXPERIMENTAL

3 Parte Experimental

3.1 CONDICIONES GENERALES DE REACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE PARTIDA

Todas las reacciones descritas en este trabajo se han llevado a cabo en condiciones de atmósfera de argon, empleando líneas de vacío y técnicas de Schlenk convencionales.

Los disolventes utilizados se han destilado previamente bajo atmósfera de argon, utilizando hidruro de calcio (acetonitrilo, diclorometano), sulfato de calcio (acetona) o el metóxido de magnesio (metanol) como agentes deshidratantes, según métodos descritos en la bibliografía⁴³, o bien se han utilizado directamente (hexano, tolueno, éter dietílico) desde un sistema de purificación de disolventes Pure-Solv 400 Solvent Purification System (Scharlab).

Los compuestos $[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})]^{44,45,46}$, y $[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{COD})]^{47}$, así como el ligando Tp⁴⁸ y la fosfina PTA²⁵, han sido sintetizados siguiendo los métodos descritos en la bibliografía. El resto de los reactivos fueron adquiridos de fuentes comerciales y usados sin purificación previa.

3.2 TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los complejos descritos en este trabajo se han caracterizado mediante el empleo de las siguientes técnicas:

- **Espectroscopía de Infrarrojo (IR):**

Los espectros se han realizado utilizando un espectrómetro PERKIN-ELMER 1720-XFT. Todos ellos se han efectuado en estado sólido (pastillas de KBr) recogiendo una zona del espectro comprendida entre 4000 y 450 cm^{-1} . Las vibraciones de tensión se expresan en números de onda (cm^{-1}). La intensidad de las bandas de absorción se indica de acuerdo a la siguiente secuencia: d = débil, m = media, f = fuerte y mf = muy fuerte. El error en la determinación de las posiciones para las absorciones es del orden de $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$.

- **Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN):**

Los espectros de resonancia magnética nuclear se han realizado en los espectrómetros BRUKER AV-300 y DPX-300 [a 300.1 MHz (^1H), 75.4 MHz (^{13}C) ó 121.5 MHz (^{31}P)], BRUKER AV-400 y NAV-400 [a 400.1 MHz (^1H), 100.6 MHz (^{13}C) ó 161.9 MHz (^{31}P)], y BRUKER AV-600 [a 600.1 MHz (^1H), 150.8 MHz (^{13}C) ó 242.9 MHz (^{31}P)] empleando tubos de 5 mm de diámetro y la señal del deuterio del disolvente como ajuste interno.

Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm). Se ha empleado tetrametilsilano (TMS) para los espectros de protón y carbono-13 como referencia interna y ácido fosfórico (85%) como referencia externa de fósforo-31.

Los espectros de carbono-13 y fósforo-31 se han realizado con desacoplamiento total del protón, lo que se expresa como $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Para la asignación de los espectros de RMN de carbono-13 se han realizado experimentos DEPT-135 (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer) así como experimentos de RMN bidimensionales, HSQC, COSY.

La multiplicidad de las señales aparece entre paréntesis de acuerdo con la secuencia detallada a continuación: s = singulete, sa = singulete ancho, d = doblete, da = doblete aparente, t = triplete, ta = triplete aparente, m = multiplete.

Las señales correspondientes al ligando Tp en los espectros de ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ se han asignado de acuerdo con la numeración de átomos que se muestra en la **Figura 4.1**.

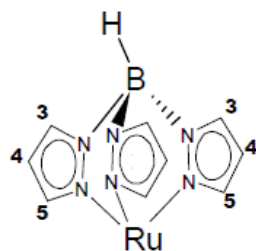


Figura 4.1: Numeración de los átomos del ligando Tp

En las señales de resonancia correspondientes al ligando Tp se dan los valores de desplazamiento químico y multiplicidad. Todas las constantes de acoplamiento en los espectros de RMN de protón $^3J_{\text{HH}}$ debidas a los anillos de pirazol del ligando Tp tienen valores entre 2.0 y 2.5 Hz.

Análisis elemental de C, H y N: Las medidas de análisis elemental se han llevado a cabo con un microanalizador LECO CHNS-Truspec en la Universidad de Sevilla.

Espectrometría de Masas (E/M): Los espectros de masas con ionización por Electrospray (ESI) se han realizado en un espectrómetro Bruker MicroFlex, operando en modo positivo o negativo y empleando ditranol (DIT) como matriz, en un instrumento Ion Trap Bruker Esquire-6000; 6000Da, con disoluciones de diclorometano (1/1000) y metanol (1/1000). Dichos espectros se han realizado en el Instituto de Investigación Química de Sevilla (responsable del Servicio: Gloria Gutiérrez Alcalá).

3.3 ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

-Estudios de retardo en la movilidad de ADN por desplazamiento en gel: Las reacciones ensayadas entre el ADN y los complejos de rutenio se han llevado a cabo en una disolución de tampón fosfato 10 mM, a pH fisiológico (7.0). Bajo estas condiciones se hizo reaccionar 0.05 g/L de un plásmido pBR322 (4361 pares de bases) con el volumen necesario, en cada caso, de una disolución recién preparada del complejo de rutenio disuelto en el tampón fosfato. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C durante 14h. Transcurrido este tiempo, se mezclaron 10 µl de cada muestra con 1 µl de revelador (0,25 mg de azul de bromofenol, 1 ml de glicerol y 1 ml de agua destilada). Cada muestra se analizó por electroforesis en gel, empleando geles de agarosa al 0.8%, en un tampón TBE. Tras 10 min. de incubación las muestras fueron fotografiadas bajo luz UV.

- Citometría de flujo

Línea celular y condiciones de cultivo: la línea celular HeLa se ha obtenido del banco de células de la Unidad de Ensayos Biotecnológicos y Biomédicos de los SCTs de la Universidad de Oviedo. Las células se han cultivado en frascos de T-25 conteniendo DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y L-Glutamina 2 mM. Posteriormente, se han incubado a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ y se han subcultivado¹ mediante tripsinización² (0.05% tripsina/0.02% EDTA).

Determinación de la apoptosis por citometría de flujo: las células HeLa se han sembrado a una densidad de 50000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se han incubado durante 24 horas a 37 °C. Pasado este tiempo, se añaden los complejos de rutenio sintetizados en una concentración 10 µM y se incuban durante 72 horas. Después de la

¹ El término “subcultivar” se emplea cuando el contenido de células se trasvasa de un soporte a otro para seguir manteniéndolas vivas.

² La tripsinización es una técnica que permite separar las células de su soporte mediante el empleo de un enzima, la tripsina, que rompe las uniones de las células al soporte de un cultivo, así como las uniones entre las células de un tejido.

incubación las células se han tripsinizado y se han recogido por centrifugación. Posteriormente, se han lavado tres veces con 10 mL de PBS y se han resuspendido en un tampón de unión (10 mM HEPES³/NaOH, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 25 mM) al que se le han añadido previamente 2 µl de anexina V-FITC (Sigma, 0.2 µg/ml) y 2.5 µl de yoduro de propidio (0.5 µg/ml). La suspensión se ha incubado 10 minutos en oscuridad y se ha analizado la fluorescencia de las células individuales en un citómetro de flujo (Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA). La fluorescencia media se ha determinado para un mínimo de 10⁴ células empleando el software Cytomics RXP (Beckman, Miami, Florida, USA).

3.4 SÍNTESIS DE COMPLEJOS

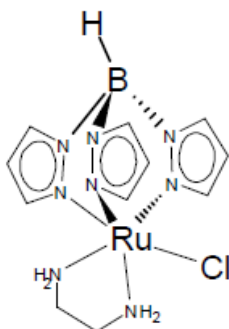
HIDRUOTRIS(PIRAZOLIL)BORATO DE RUTENIO (II) CON LIGANDOS N-DADORES.

3.4.1. Síntesis y caracterización del complejo [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(en)] (1)

Sobre una disolución del complejo [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(COD)] (91 mg, 0.199 mmol) en tolueno (15 ml) se añaden 5 equivalentes de etilendiamina (67 µl, 0.994 mmol). La mezcla de reacción se calienta a temperatura de reflujo con agitación durante 2 h. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente a sequedad y el sólido marrón resultante se lava con éter (3 x 20 ml) y se seca a vacío.

³ HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etanosulfónico)) es un reactivo orgánico zwitteriónico utilizado en disoluciones tampón para mantener el pH fisiológico.

[RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(en)] (1)



Rendimiento:	60%
Color:	marrón
Fórmula molecular:	C₁₁H₁₈BClN₈Ru
Peso molecular:	409.63 g/mol
Solubilidad en agua:	2.37 mg/ml

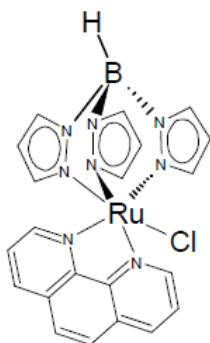
IR (KBr, cm⁻¹): 2465 m (BH)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 20°C): 8.18 (d, 1H, H^{3,5} pz), 8.05 (da, 1H, H^{3,5} pz), 7.75 (d, 2H, H^{3,5} pz), 7.62 (d, 2H, H^{3,5} pz), 6.23 (m, 3H, pz), 3.34 (m, 2H, CH₂), 3.01 (m, 2H, CH₂), 1.91 (m, 4H, NH₂) ppm.

3.4.2. Síntesis y caracterización de complejos [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(N-N)] [N-N = phen (2), 2,2'-bipy (3)].

Sobre una disolución del complejo [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(COD)] (100 mg, 0.219 mmol) en DMF (10 ml), se añaden 5 equivalentes del ligando N-dador, bidentado correspondiente (1.095 mmol). La mezcla de reacción se calienta a la temperatura de reflujo del disolvente con agitación durante 2 h. A continuación, se evapora el disolvente a vacío y el sólido resultante se extrae con DCM. Se filtra sobre kieselguhr y los disolventes se evaporan a sequedad. Se lava con éter (3 x 15 ml) y con hexano (3 x 15 ml) y se seca a vacío.

[RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(phen)] (2)



Rendimiento:	88.3%
Color:	morado oscuro
Fórmula molecular:	C₂₁H₁₈BClN₈Ru
Peso molecular:	529.76 g/mol
Solubilidad en agua:	0.24 mg/ml

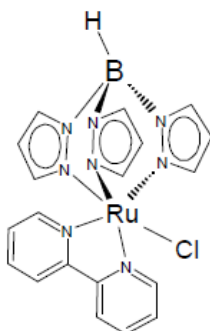
EM (ESI): m/z 563.3 [M+ MeOH]⁺ (100%)

IR (KBr, cm⁻¹): 2480 m (BH)

¹H RMN (300 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 9.24 (da, 2H, phen), 8.33 (da, 2H, phen), 8.25 (d, 2H, H^{3,5} pz), 8.09 (s, 2H, phen), 7.93(d, 2H, H^{3,5} pz), 7.72 (dd, 1H, H⁴ pz), 7.70 (m, 2H, phen), 6.48 (ta, 2H, H^{3,5} pz), 5.79 (ta, 1H, H⁴ pz), 5.60 (d, 1H, H⁴ pz) ppm.

¹³C{¹H} RMN (100.6 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 153.4 (s, 2C, phen), 144.4 (s, 2C, C^{3,5} pz), 139.7 (s, 1C, C⁴ pz), 136.1 (s, 2C, phen), 135.7 (s, 2C, C^{3,5} pz), 130.1 (s, 2C, cuatern. phen), 128.8 (s, 2C, cuatern. phen), 127.3 (s, 2C, phen), 123.5 (s, 1C, C⁴ pz), 122.9 (s, 2C, phen), 106.7 (s, 2C, C^{3,5} pz), 105.0 (s, 1C, C⁴ pz) ppm.

[RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(2-2'-bipy)] (3)



Rendimiento:	79.8%
Color:	violeta
Fórmula molecular:	C₁₉H₁₈BClN₈Ru
Peso molecular:	505.75 g/mol
Solubilidad en agua:	0.72 mg/ml

EM (ESI): m/z 506.2 [M+1]⁺ (100%)

IR (KBr, cm⁻¹): 2479 m (BH)

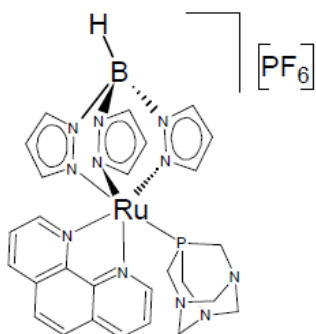
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 20°C): 8.86 (d, 2H, bipy.), 8.23 (d, 2H, bipy.), 8.17 (d, 2H H^{3,5} pz), 7.81 (d, 2H H^{3,5} pz) 7.71 (m, 4H, bipy), 7.25 (m, 1H, H⁴ pz), 6.39 (ta, 2H, H^{3,5} pz), 5.93 (ta, 1H, H⁴ pz), 5.88 (ta, 1H, H⁴ pz) ppm.

¹³C{¹H} RMN (400 MHz, CDCl₃, 20°C): 153.5 (s, 2C, bipy.), 151.4 (s, 2C, bipy. cuaternarios), 144.1 (s, 2C, C^{3,5} pz), 140.1 (s, 1C, C⁴ pz), 135.41 (s, 2C, C^{3,5} pz), 133.2 (s, 2C, bipy.), 127.3 (s, 1C, C⁴ pz), 124.3 (s, 2C, bipy.), 122.0 (s, 2C, bipy.), 106.6 (s, 2C, C^{3,5} pz), 105.4 (s, 1C, C⁴ pz) ppm.

3.4.3 Síntesis y caracterización de complejos [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(N-N)(PTA)] [PF₆] [N-N = phen (4), 2,2'-bipy (5)].

Sobre una disolución del complejo [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(N-N)] [N-N = phen (2), 2,2'-bipy (3)] , 0.168 mmol, 89 mg (2), 85 mg (3)] y 3 equivalentes de NaPF₆ (89.6 mg, 0.504 mmol) en MeOH (30 ml) se añade 1 equivalente de PTA (26.56 mg, 0.168 mmol). La mezcla de reacción se calienta a temperatura de reflujo durante 6 h. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se evapora, dando lugar a un sólido que se disuelve en DCM. La disolución resultante se filtra sobre tierras diatomeas. Se evapora el disolvente y el sólido obtenido se lava con éter (3 x 15 ml) y con hexano (3 x 15 ml) y se seca a vacío.

[Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(phen)(PTA)][PF₆] (4)



Rendimiento:	73.9 %
Color:	marrón
Fórmula molecular:	C₂₇H₃₀BF₆N₁₁P₂Ru
Peso molecular:	796.42 g/mol
Solubilidad en agua:	1.88 mg/ml

EM (ESI): m/z 652.3 [M+1]⁺ (100%)

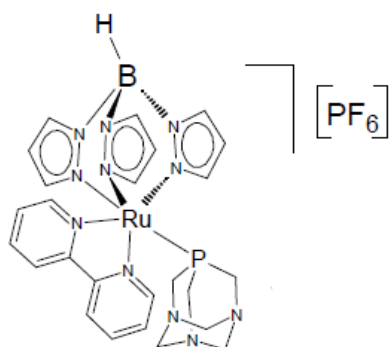
IR (KBr, cm⁻¹): 2482 m (BH)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 20°C): 9.10 (d, 2H, phen), 8.41 (d, 2H, phen), 8.26 (d, 2H, H^{3,5} pz), 8.08 (sa, 2H, phen), 7.98 (da, 2H, H^{3,5} pz), 7.90-7.52 (m, 3H, phen, H⁴ pz), 6.59 (ta, 2H H^{3,5} pz), 5.88 (ta, 1H, H⁴ pz), 5.58 (ta, 1H, H⁴ pz), 4.36 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 4.15 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 3.39 (s, 6H, NCH₂P)

¹³C{¹H} RMN (400 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 153.2 (s, 2C, phen.), 145.1 (s, 2C, C^{3,5} pz), 141.3 (s, 1C, C⁴ pz), 137.1 (s, 2C, phen.), 135.6 (s, 2C, C^{3,5} pz), 130.9 (s, 2C, cuatern. phen.), 130.8 (s, 2C, cuatern. phen.), 128.0 (s, 2C, phen.), 124.8 (s, 1C, C⁴ pz), 123.0 (s, 2C, phen.), 107.5 (s, 2C, C^{3,5} pz), 105.8 (s, 1C, C⁴ pz), 73.0 (d, 3CH₂, ³J_{CP} = 6, PTA), 50.2 (d, 3CH₂, J_{CP} = 14 Hz, PTA) ppm.

³¹P{¹H} RMN (161.9 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): -31.6 (s, PTA), -143.8 (sept., PF₆⁻) ppm.

[Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(2-2'-bipy)(PTA)] [PF₆] (5)



Rendimiento:	75.4 %
Color:	marrón anaranjado
Fórmula molecular:	C₂₅H₃₀BF₆N₁₁P₂Ru
Peso molecular:	772.40 g/mol
Solubilidad en agua:	1.25 mg/ml

EM (ESI): *m/z* 628.3 [M+1]⁺ (100%)

IR (KBr, cm⁻¹): 2479 m (BH)

¹H RMN (300 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 8.74 (d, 2H, bipy), 8.50 (d, 2H, bipy), 8.18-8.05 (m, 2H, H^{3,5} pz), 8.02-7.78 (m, 6H, bipy, H^{3,5}), 7.51 (ta, 1H, H⁴ pz), 6.54 (ta, 2H, H^{3,5} pz), 6.11 (sa, 1H, H⁴ pz), 6.08 (sa, 1H, H⁴ pz), 4.45 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 4.33 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 3.52 (sa, 6H, NCH₂P) ppm.

¹³C{¹H} RMN (400 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 153.3 (s, 2C, bipy.), 151.2 (s, 2C, bipy. Cuat.), 145.0 (s, 2C, C^{3,5} pz), 138.0 (s, 1C, C⁴ pz), 137.3 (s, 2C, C^{3,5} pz), 136.2 (s, 2C, bipy.), 127.9 (s, 1C, C⁴ pz), 126.6 (s, 2C, bipy.), 123.7 (s, 2C, bipy.), 107.5 (s, 2C, C^{3,5} pz), 105.8 (s, 1C, C⁴ pz), 73.3 (d, 3CH₂, ³J_{CP} = 6 Hz, PTA), 50.4 (d, 3CH₂, J_{CP} = 14 Hz, PTA) ppm.

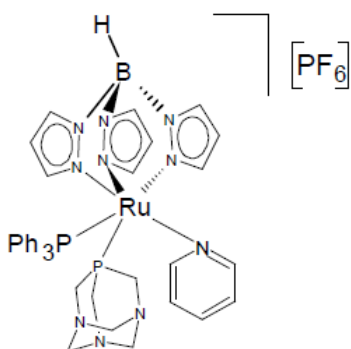
³¹P{¹H} RMN (161.9 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): -32.0 (s, PTA), -144.5 (sept., PF₆⁻) ppm

3.4.4 Síntesis y caracterización de complejo [Ru{κ³(N,N,N)-Tp}(PPh₃)(PTA)(L)][PF₆] [L = N-dadores = py (6), quinolina (7)]

A una disolución del complejo [RuCl{κ³(N,N,N)-Tp}(PPh₃)(PTA)] (50 mg, 0.065 mmol) y 3 equivalentes de NaPF₆ (33.5 mg, 0.195 mmol), en 10 ml de MeOH, se

añaden 3 equivalentes del ligando N-dador correspondiente, 0.195 mmol, 15.6 μl (py), 23 μl (quinolina). Se calienta la mezcla de reacción a reflujo durante 6h. Se evapora el disolvente a sequedad y el sólido resultante se disuelve en DCM. Se filtra sobre tierras diatomeas. La disolución se concentra hasta aprox. 5 ml. Adición de hexano (20 ml), conduce a la precipitación de un sólido. Se decantan los disolventes y el sólido se lava con hexano (3 x 10 ml).

[Ru $\{\kappa^3(N,N,N)\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})(\text{py})$] [PF₆] (6)



Rendimiento:	90.5 %
Color:	blanco amarillento
Fórmula molecular:	C₃₈H₄₂BF₆N₁₀P₃Ru
Peso molecular:	957.60 g/mol
Solubilidad en agua:	2.25 mg/ml

EM (ESI): m/z 813.3 [M+1]⁺ (42%), 734.3 [M-py]⁺ (100%).

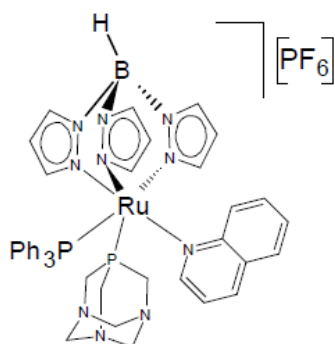
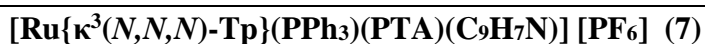
IR (KBr, cm⁻¹): 2486 m (BH)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 20°C): 8.10 (sa, 1H, py), 7.97 (d, 2H, py), 7.89 (d, 2H, py), 7.82 (d, 2H, H^{3,5} pz), 7.73 (ta, 2H, H^{3,5} pz), 7.48-7.22 (m, 15H, PPh₃), 7.17 (sa, 1H, H^{3,5} pz), 7.06 (sa, 1H, H^{3,5} pz), 6.50 (sa, 1H, H⁴ pz), 6.33 (ta, 1H, H⁴ pz), 5.94 (sa, 1H, H⁴ pz) 4.46 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 4.23 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 3.44 (sistema de spin CD, 3H, NCH₂P, J_{HCHD} = 14Hz), 3.30 (sistema de spin CD, 3H, NCH₂P, J_{HCHD} = 14Hz) ppm.

¹³C{¹H} RMN (400 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 149.3 (s, 2C, py), 147.7 (s, 1C, C³ pz), 145.2 (s, 1C, C³ pz), 144.4 (s, 1C, C³ pz), 140.7 (s, 1C, py), 137.9 (s, 1C, C⁵ pz), 137.2 (s, 1C, C⁵ pz), 136.9 (s, 1C, C⁵ pz), 136.2 (sa, 3C, PPh₃), 133.8 (d, 6C, ³J_{CP} = 9Hz, PPh₃),

130.2 (sa, 3C, PPh₃), 128.5 (sa, 3C, cuat. PPh₃), 125.6 (s, 2C, py), 108.5 (s, 1C, C⁴ pz), 108.1 (s, 1C, C⁴ pz), 106.8 (s, 1C, C⁴ pz), 71.13 (d, 3C, NCH₂N, ³J_{CP} = 6 Hz, PTA), 48.6 (d, 3CH₂, NCH₂P, J_{CP} = 13 Hz, PTA) ppm.

³¹P{¹H} RMN (161.9 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 41.4 (d, ²J_{PP} = 30 Hz, PPh₃), -43.8 (d, ²J_{PP} = 30 Hz, PTA), -144.3 (sept., PF₆⁻) ppm.



Rendimiento:

73.9 %

Color:

amarillo anaranjado

Fórmula molecular:

C₄₂H₄₄BF₆N₁₀P₃Ru

Peso molecular:

1007.66 g/mol

Solubilidad en agua:

1.03 mg/ml

EM (ESI): *m/z* 863.3 [M+1]⁺ (10.4%), 734.3 [M-quinolina]⁺ (100%).

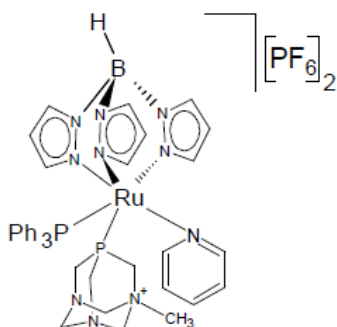
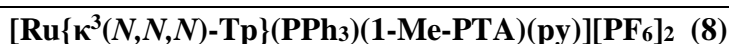
IR (KBr, cm⁻¹): 2483 m (BH)

¹H RMN (300 MHz, CD₂Cl₂, 20°C): 8.89 (m, 1H, quin.), 8.28-7.87 (m, 6H, quin.), 7.72 (s, 2H, H^{3,5} pz), 7.53-7.12 (m, 17H, PPh₃, H^{3,5}), 6.70 (m, 1H^{3,5} pz), 6.65 (m, 1H, H⁴ pz), 6.20 (m, 1H, H^{3,5} pz), 5.84 (m, 1H, H⁴ pz), 5.79 (m, 1H⁴ pz), 4.74 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 4.52 (sistema de spin AB, 3H, NCH₂N, J_{HAHB} = 13Hz), 4.09 (sistema de spin CD, 3H, NCH₂P, J_{HCHD} = 14Hz), 3.89 (sistema de spin CD, 3H, NCH₂P, J_{HCHD} = 14Hz) ppm.

³¹P{¹H} RMN (161.9 MHz, THF, 20°C): 41.3 (d, ²J_{PP} = 30 Hz, PPh₃), -24.2 (d, ²J_{PP} = 30 Hz, PTA), -145.8 (sept., PF₆⁻) ppm.

3.4.5. Síntesis y caracterización de los complejos $[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{1-Me-PTA})(\text{L})][\text{PF}_6]_2$ [L = N-dadores = py (8), quinolina (9)]

Sobre una disolución del complejo $[\text{Ru}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{PTA})(\text{L})][\text{PF}_6]$ [L = N-dadores = py (6), quinolina (7)], 0.104 mmol, 100 mg (6), 105 mg (7), en 5 ml de DCM (6), THF (7), se añaden 5 equivalentes de MeI (33 μl , 0.522 mmol). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 días. La adición de 3 equivalentes de NaPF_6 sobre la mezcla de reacción conduce a la formación de la sal de hexafluorofosfato. La disolución se filtra sobre tierras diatomeas y se concentra hasta aprox. 4 ml. Al añadir hexano (15 ml), precipita un sólido. Se decanta el disolvente y el sólido se lava con hexano (3 x 20 ml) y se seca a vacío.



Rendimiento:	64.6 %
Color:	pardo
Fórmula molecular:	$\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{BF}_{12}\text{N}_{10}\text{P}_4\text{Ru}$
Peso molecular:	1117.59 g/mol
Solubilidad en agua:	1.20 mg/ml

EM (ESI): m/z 973.2 $[\text{M}+\text{PF}_6]^+$ (45.4 %), 876.2 $[\text{M}-\text{py}-\text{CH}_3]^+$ (100%).

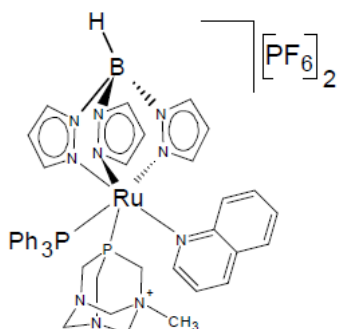
IR (KBr, cm^{-1}): 2486 m (BH)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 20°C): 8.05 (da, 1H, py), 8.02 (da, 2H, py), 7.94 (da, 2H, py), 7.87 (ta, 2H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 7.80-7.73 (m, 2H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 7.57-7.17 (m, 15H, PPh_3), 7.15 (sa, 1H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 7.11 (sa, 1H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 6.52 (sa, 1H, H^4 pz), 6.41 (sa, 1H, H^4 pz), 6.04 (sa, 1H, H^4 pz) 5.04-4.5 (m, 4H, PTA), 4.24-3.84 (m, 4H, PTA), 3.81-3.69 (m, 2H, PTA) 3.24-3.04 (m, 2H, PTA), 2.67 (sa, 3H, CH_3 -PTA) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (400 MHz, CD_2Cl_2 , 20°C): 148.1 (s, 2C, py), 147.0 (s, 1C, C^3 pz), 145.5 (s, 1C, C^3 pz), 143.7 (s, 1C, C^3 pz), 138.5 (s, 1C, py), 137.9 (s, 1C, C^5 pz), 137.5 (s, 1C, C^5 pz), 136.6 (s, 1C, C^5 pz), 136.6 (sa, 3C, PPh_3), 134.7 (d, 6C, $^3\text{J}_{\text{CP}} = 9\text{Hz}$, PPh_3), 130.1 (sa, 3C, PPh_3), 128.1 (sa, 3C, PPh_3), 126.1 (s, 2C, py), 108.9 (s, 1C, C^4 pz), 108.4 (s, 1C, C^4 pz), 106.9 (s, 1C, C^4 pz), 80.5 (d, 2C, $^3\text{J}_{\text{C,P}} = 8\text{ Hz}$, NCH_2N), 69.6 (sa, 1C, NCH_2N), 55.2 (sa, 1C, $\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{P}$), 49.4 (s, 1C, $\text{CH}_3\text{-N}$), 46.9 (sa, 1C, NCH_2P) 46.7 (sa, 1C, NCH_2P) ppm.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN (161.9 MHz, CD_2Cl_2 , 20°C): 37.8 (d, $^2\text{J}_{\text{PP}} = 30\text{ Hz}$, PPh_3), -24.7 (d, $^2\text{J}_{\text{PP}} = 30\text{ Hz}$, PTA), -143.3 (sept., PF_6^-) ppm.

[Ru $\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}$ (PPh_3)(1-Me-PTA)(quinolina)] [PF_6] $_2$ (9)



Rendimiento:	45.1 %
Color:	verde amarillento
Fórmula molecular:	$\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{BF}_{12}\text{N}_{10}\text{P}_4\text{Ru}$
Peso molecular:	1167.66 g/mol
Solubilidad en agua:	1.74 mg/ml

EM (ESI): m/z 876.2 [$\text{M}-1$] $^+$ (47.0%), 781.3 [$\text{M}-\text{quinolina}+\text{MeOH}$] $^+$ (100 %),

IR (KBr, cm^{-1}): 2484 m (BH)

^1H RMN (300 MHz, THF, 20°C): 8.50 (m, 1H, quin.), 8.20-8.05 (m, 2H, quin.), 7.82 (sa, 2H, quin.), 7.76 (sa, 2H, quin.), 7.71 (m, 2H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 7.61-7.21 (m, 15H, PPh_3) 6.98 (sa, 1H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 6.65 (sa, 1H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 6.20 (sa, 2H, $\text{H}^{3,5}$ pz), 5.91 (sa, 1H, H^4 pz), 5.81 (sa, 1H, H^4 pz), 5.53 (sa, 1H, H^4 pz) 4.95-4.55 (m, 4H, PTA), 4.52-3.90 (m, 4H, PTA), 3.89-3.78 (m, 2H, PTA) 3.37-3.34 (m, 2H, PTA), 2.66 (sa, 3H, $\text{CH}_3\text{-PTA}$) ppm.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (400 MHz, THF, 20°C): 146.7 (s, 1C, quin.), 146.1 (s, 1C, C³ pz), 143.6 (s, 1C, C³ pz), 142.2 (s, 1C, C³ pz), 134.3 (s, 1C, quin.), 137.9 (s, 1C, C⁵ pz), 137.5 (s, 1C, C⁵ pz), 136.6 (s, 1C, C⁵ pz), 132.8 (sa, 3C, PPh₃), 132.4 (d, 6C, ³J_{CP} = 9Hz, PPh₃), 131.8 (sa, 3C, PPh₃), 127.8 (sa, 3C, PPh₃), 127.4 (s, 1C, quin.), 126.1 (da 2C, quin.), 125.8 (da, 2C, quin.), 104.6 (s, 1C, C⁴ pz), 103.9 (s, 1C, C⁴ pz), 102.9 (s, 1C, C⁴ pz), 78.6 (sa, 2C, NCH₂N), 70.2 (sa, 1C, NCH₂N), 57.7 (sa, 1C, CH₃NCH₂P), 51.8 (s, 1C, CH₃-N), 48.2 (sa, 1C, NCH₂P) 46.9 (sa, 1C, NCH₂P) ppm.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN (161.9 MHz, THF, 20°C): 40.7 (d, ²J_{PP} = 30 Hz, PPh₃), -13.5 (d, ²J_{PP} = 30 Hz, PTA), -144.3 (sept., PF₆⁻) ppm.

BIBLIOGRAFÍA

4 Bibliografía

1. a) Gasser, G.; Metzler-Nolte, N., *Chem. Biol.*, **2012**, 16, 84. Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N., *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3. b) Farrell, N. *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **1999**.
2. Ho, Y. P.; Au Yeung, S.C.F.; To, K. K.W. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23,633
3. Giaccone, G. *Drugs*, **2000**, 59, 9.
4. Kay, P. *Semin. Oncol. Nurs.* **2006**, 22,1.
5. Wernyj, R. P.; Morin, P.J. *Drug Resist. Updates* **2004**, 7, 227
6. Wong, E.; Giandomenico, C. M. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2451
7. a) Mühlgasner, G.; Bartel, C.; Schmid, W. F.; Jakupec, M. A.; Arion, V.B.; Keppler, B. K., *J. Inorganic Biochemistry*, **2012**, 116, 180. b) Boff, B.; Gaiddon, C.; Pfeffer, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 2705. c) Gianferrara, T.; Brastos, I.; Alessio, E. , *Dalton Trans.*, **2009**, 758
8. Dweyer, D. S.; Gordon, K.; Jones, B. *Int. J. Immunopharmacol.* **1995**, 17, 931
9. Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Ellis, D. J.; Salter, P. A., Scopelliti, R. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 35.
10. Sánchez-Delgado, R. A.; Navarro, M.; Pérez, H.; Urbina, J.A. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1095.
11. Sun,H.Z.;Li, H. Y.; Sadler, P.J. *Chem.Rev.* **1999**, 99, 2817
12. Clarke, M. J. *Met. Ions Biol. Syst.* **1980**, 11, 231
13. J. M. Rademaker-Lakhai, D.; van der Bongard, D.; Pluim, J. H.; Beijnen and J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10, 3717

14. C. Dittrich, M. E.; Scheulen, U. Jaehde, B.; Kynast, M.; Gneist, H.; Richly, S.; Schaad, V.; B. Arion and B. K. Keppler, *Proc. Am. Cancer Res.*, **2005**, 46, P472
15. Cocchietto, M.; Zorzet, S.; Sorc, A.; Sava, G. *Invest. New Drugs* **2003**, 21, 55
16. Kapitza, S.; Pongratz, M.; Jakupec, M. A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Lackinger, L.; Keppler, B. K.; Marian, B.J., *Cancer Res. Clin. Oncol.* **2005**, 131, 101.
17. a) Sava, G.; Bergamo, A., *Dalton Trans.*, 2011, 40, 7817. b) Süss-Fink, G., *J. Organometallic Chem.*, 2013, 1. c) Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 236, 209
18. Hartinger, C.G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, A.; Kynast, B. Zorbas, H.; Keppler, B. K., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 891.
19. Gopal, Y. N. V.; Jayaraju, D.; Kondapi, A. K., *Biochemistry* **1999**, 38, 4382.
20. Dougan, S. J.; Sadler, P. J., *Chimia*, **2007**, 61, 704.
21. Chen, H.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 173
22. Chen, H.; Parkinson, J. A.; Parson, S.; Coxall, R. A.; Gould, R. O.; Sadler, P. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3064.
23. a) Murray, B. S.; Menin, L.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J., *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 2536. b) Renfrew, A. K.; Egger, A. E.; Hartinger, C. G.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J., *C. R. Chimie*, **2010**, 13, 1144. c) Dorcier, A.; Hartinger, C. G.; Scopelliti, R.; Fish, R. H.; Keppler, B. K.; Dyson, P. J., *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 1066. d) Scolaro, C.; Bergamo, A.;

- Bersacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurency, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J.; *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4161.
24. Daigle, D. J.; Pepperman Jr., A. B.; Vail, S. L., *J. Heterocycl. Chem.* **1974**, 11, 407.
25. Daigle, D. J. *Inorg. Synth.* **1998**, 32, 40.
26. Delerno, J. R.; Trefonas, L. M.; Darensbourg, M. Y.; Majeste, R., *J. Inorg. Chem.* **1976**, 32, 40.
27. Ang, W. H.; Casini, A.; Sava, G.; Dyson, P.J., *J. Organom. Chem.* **2011**, 696, 989.
28. Ang, W. H.; Daldini, E.; Scolaro, C.; Scopelliti, R.; Juillerat-Jeannerat, L.; Dyson, P.J, *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 9006.
29. Scolaro, C.; Chaplin, A. B.; Hartinger, C. G.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Keppler, B. K.; Sava, G.; Dyson, P. J., *Dalton Trans.* **2007**, 5065.
30. Darensbourg, D. J.; Ortiz, D. G.; Kamplain, J. W., *Organometallics* **2004**, 23, 1747.
31. Vock, C. A.; Scolaro, C.; Phillips, A. D.; Scopelliti, R.; Sava, G.; Dyson, P. J., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5552.
32. Pandey, D. S.; Sahay, A. N.; Agarwala, U. C., *Indian J. Chem.* **1996**, A35, 434.
33. Singh, S. K.; Trivedi, M.; Chandra, M.; Sahay, A. N.; Pandey, D. S., *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 8600.
34. Clavel, C. M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Griffioen, A. W.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J., *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 3546.
35. Kilpin, K. J.; Clavel, C. M.; Edefe, F.; Dyson, P.J., *Organometallics*, **2012**, 31, 7031.

36. García de la Arada, I.; Díez, J.; Gamasa, M. P.; Lastra, E., *Organometallics*, **2013**, 32, 4342.
37. García-Fernández, A.; Díez, J.; Gamasa, M. P.; Lastra, E., *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 2471.
38. García-Fernández, A.; Díez, J.; Gamasa, M. P.; Lastra, E., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 917.
39. García-Fernández, A.; Díez, J.; Manteca, A.; Sánchez J.; García-Navas, R.; Sierra, B. G.; Mollinedo, F.; Gamasa, M. P.; Lastra, E., *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 10196.
40. Menéndez-Pedregal, E.; Díez, J.; Manteca, A.; Sánchez J.; Bento, A. C.; García-Navas, R.; Mollinedo, F.; Gamasa, M. P.; Lastra, E., *Dalton Trans.*, **2013**, 42, 13955.
41. Trofimenko, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1842.
42. Slugovc, C.; Schmid, R.; Kirchner, K., *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 185-186, 109.
43. Perrin, D. D.; Armarengo, W. L. F.; Perrin, D. R., *Purification of Laboratory Chemicals*, 2^a Ed., Pergamon Press.
44. Gemel, C.; Trimmel, G.; Slugovc, C.; Kremel, S.; Mereiter, K.; Schmid, R.; Kirchner, K., *Organometallics*, **1996**, 15, 3998.
45. Allock, N. W.; Burns, I. D.; Claire, K. S.; Hill, A. F.; *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 2906.
46. García-Fernández, A.; Díez, J.; Manteca, A.; Sánchez J.; Gamasa, M. P.; Lastra, E., *Polyhedron*, **2008**, 27, 1214.
47. Wilson, D.C.; Nelson, J. H.; *J. Organomet. Chem.* **2003**, 682, 272
48. Trofimenko, S., *Inorganic Synth.*, **1970**, 12, 99.

49. Alfaro-Moreno, E.; García-Cuéllar, C.; Dueñas-González, A.,
Cancerología **2000**, *46*, 275.